



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 5/10, 15/12, A61K 39/395, G01N 33/50, C12Q 1/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/14204</p> <p>(43) 国際公開日 2000年3月16日(16.03.00)</p>						
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04771</p> <p>(22) 国際出願日 1999年9月2日(02.09.99)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平10/250656</td> <td>1998年9月4日(04.09.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平11/123252</td> <td>1999年4月28日(28.04.99)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 学校法人 慶應義塾(KEIO UNIVERSITY)[JP/JP] 〒108-8345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 西本育夫(NISHIMOTO, Ikuo)[JP/JP] 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学 医学部内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p>		特願平10/250656	1998年9月4日(04.09.98)	JP	特願平11/123252	1999年4月28日(28.04.99)	JP	<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平10/250656	1998年9月4日(04.09.98)	JP						
特願平11/123252	1999年4月28日(28.04.99)	JP						
<p>(54)Title: NERVE CELL DEATH RECEPTOR</p> <p>(54)発明の名称 神経細胞死受容体</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A system inducing cell death at a high efficiency which has been developed by preparing nerve cells with the stable and excessive expression of APP and treating these nerve cells with an APP agonist. Also, cell death is successfully induced at a higher efficiency by preparing a nerve cell system wherein the expression of mutated APP by familial Alzheimer's disease can be induced by an external stimulus and inducing the expression of the mutated APP. Use of these systems makes it possible to screen a drug capable of controlling the cell death in sporadic and familial Alzheimer's disease. The thus obtained drug inhibiting the cell death through the activation of APP is useful as a remedy for diseases involving Alzheimer's disease in which nerve cell death participates and thus the nerve cell death should be inhibited.</p>								

(57)要約

APPを安定に過剰発現する神経細胞を作製し、該神経細胞にAPPアゴニストを作用させることによって、高い効率で細胞死を誘導する系を開発した。また、家族性アルツハイマー病変異APPの発現を外的刺激により誘導できる神経細胞系を作成し、該変異APPの発現誘導により高い効率で細胞死を誘導することに成功した。これらの系を用いて、孤発性ならびに家族性アルツハイマー病における細胞死を制御する薬剤のスクリーニングが可能となった。本発明によって得られるAPPの活性化による細胞死を阻害する薬剤は、神経細胞の細胞死を抑制する必要がある、アルツハイマー病を含む神経細胞死が関与する疾患の治療のための薬剤として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
HA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	CW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

神経細胞死受容体

技術分野

本発明は「神経生理」の分野に属し、具体的には、神経細胞における細胞死に関する。

背景技術

アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)は、現在最も精力的に組織病理学的な研究が進められている神経変性疾患(neurodegenerative disease)の一つであり、通常、進行性の神経細胞喪失、神経細胞内集積物(intraneuronal tangles)、および細胞外の老人斑(senile plaques)が生じる。老人斑の主要成分はアミロイド β タンパク質($A\beta$)である。 $A\beta$ はAPPと呼ばれる膜貫通型の前駆体から切り出されて生じる。1987年に695残基からなるAPP₆₉₅が同定(J. Kangら, 1987, Nature, 325: 733)されて以来、現在までに少なくとも10種のAPPアイソフォームが単一遺伝子の選択的スプライシングによって生じることがわかっている(R. Sandbrinkら, 1994, J. Biol. Chem., 269: 1510)。プロテアーゼ阻害領域が欠失しているAPP₆₉₅は、主に脳で発現している(R. L. Neveら, 1988, Neuron, 1: 669; P. Ponteら, 1991, Mol. Brain Res., 9: 259)。APP欠損マウスでは中枢神経系(CNS)の発生が異常となる(U. Mullerら, 1994, Cell, 79: 755; H. Zhengら, 1995, Cell, 81: 525)ことから、APPには、 $A\beta$ の前駆体としての病理学的な機能以外に、生理学的な機能を持っていることが予想される。APPに加え、APPと高い類似性を持つAPP様分子であるAPLP2を欠損させた、二重ターゲットマウスを用いた最近の研究によって、APPには胚発生および神経の初期発生における機能があることが示唆されている(C. S. von Kochら, 1997, Neurobiol. Aging, 18: 661)。

しかし現在のところ、APPの本来の機能に関する知見は限られている。APPは神経細胞の増殖や軸索伸長に関与していると考えられている (D. Schubert et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162: 83; E.A. Milward et al., *Neuron*, 1992, 9: 129; M.P. Mattson et al., 1993, *Trends Neurosci.* 16: 409; D.H. Small et al., 1994, *J. Neurosci.* 14: 2117) が、これらの機能は可溶型APPに関するものである。唯一、膜結合型APPはシナプス部位に多いことが知られており、膜貫通型APPは神経の生理機能に関わっていると予想されている (W. Schubert et al., 1991, *Brain Res.* 563: 184)。また、繊維芽細胞におけるAPPの過剰発現が細胞接着を抑制することから、細胞表面においてAPPが機能していると予想される (K. Ueda et al., 1989, *Annals Neurol.* 25: 246)。最近、特に神経におけるAPPの細胞表面の発現の解析 (S.S. Jung et al., 1996, *J. Neurosci. Res.* 46: 336) や、APPと3量体Gタンパク質 Go との特異的相互作用 (Nishimotoら, 1993, *Nature*, 362: 75-79; Brouilletら, 1999, *J. Neurosci.* 19: 1717-1727)、細胞内Shc様シグナル伝達因子であるFe65との相互作用などの研究 (F. Fiore et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270: 30853) により、APPが神経において細胞表面受容体として機能していることが予想されている (A. Ferreira et al., 1993, *J. Neurosci.* 13: 3112; J.G. Culvenor et al., 1995, *Exp. Cell. Res.* 220: 474)。(また、*in vitro*の実験により、膜貫通型APP₆₉₅はリガンドの結合により調節されるシグナル伝達機能を有しており (T. Okamoto et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270: 4205)、家族性アルツハイマー病 (FAD) 患者に見られるAPP₆₉₅の3種の変異ではそのシグナル伝達機能が活性化されていることが示されている (T. Okamoto et al., 1996, *EMBO J.* 15: 3769)。また、ウイルスベクターによる野生型APPの過剰発現により、初代培養神経の変性が起こることが報告されている (I. Nishimura et al., 1998, *J. Neurosci.* 18: 2387)。

これまでに、家族性AD型の変異を持つAPP (FAD-APP) を一過的にF11細胞に遺伝子導入し、導入された細胞にアポトーシスが誘導されることが知られている (T.

Yamatsujiら, 1996, Science 272: 1349-1352)。しかしこの系では、ごくわずかな細胞にのみ遺伝子が発現し、細胞死が誘導されるにすぎなかった。また、惹起される細胞死の割合は、遺伝子導入効率の多寡に大きく左右された。これらの理由から、従来の系は、神経脱落に拮抗するタイプの抗アルツハイマー病根治薬のスクリーニングには著しく不向きであった。この困難を解決する方法は、安定的にFAD-APPを発現する神経細胞株を樹立することであるが、現在のところ、この試みは悉く失敗している。また、膜貫通型APP₆₉₅が、神経細胞における細胞死受容体として機能するかどうかは知られていなかった。

発明の開示

本発明は、APPの活性化による神経細胞の細胞死を誘導する方法を提供することを課題とする。さらに、本発明は、APPの活性化による神経細胞の細胞死の誘導剤および該誘導の阻害剤または促進剤、並びにそれらのスクリーニング方法およびスクリーニングのためのキットを提供することを課題とする。

本発明者らは、安定的にFAD-APPを発現する神経細胞株を樹立することが困難であるのは、APP変異体が恒常的シグナル活性型の分子であり、FAD-APPを発現する神経細胞は細胞死を起こすため、結果として株の樹立ができないのではないかと考えた。これに対して、正常型APPの細胞内シグナル入力が発現量に対する細胞死閾値は高いので、APPの安定発現株が得られやすいのではないかと考えた。APPを安定発現した神経細胞をAPPアゴニストとして機能する抗体等で処理し、ほぼ100%の効率で細胞死を誘導する系が開発できれば、一斉に細胞死を誘導できる点でも、細胞死誘導の割合の安定性の点でも、拮抗薬のスクリーニングやAPPアゴニストの検索には理想的である。また、これまで可能であったFAD-APPを用いた系は、少数の割合を占める家族性アルツハイマー病の神経細胞死モデルであったのに対し、正常型APPを用いた系が開発されれば、惹起される神経細胞死が非変異APPによるという点で、少数の割合を占める家族性アルツハイマー病ではなく、アルツ

ハイマー病の大多数を占める孤発性アルツハイマー病のインビトロモデルと考えられ、この系を用いた拮抗薬の検索は、一般のアルツハイマー病の治療薬の開発に大きく貢献すると考えられる。

そこで本発明者らは、APPのプロテアーゼ阻害領域を欠失しているが、その他のAPP細胞外領域および細胞内領域を保持している神経型アイソフォームであるAPP₆₉₅を発現するベクターを構築し、該ベクターを神経細胞株F11に導入し、APP₆₉₅を安定して発現するF11神経細胞(F11/APP細胞)を作製した。この細胞はAPP₆₉₅を親細胞であるF11細胞の約20倍過剰発現していた。この細胞に、APPの細胞外ドメインを認識する抗APPモノクローナル抗体を作用させたところ、24時間以内にほとんどの細胞でDNAの断片化やアポトーシスに典型的な核変化が誘導され、72時間でほとんどの細胞が細胞死を起こすことを見出した。また、抗APPモノクローナル抗体とAPPによって引き起こされる細胞死の特性を調べたところ、染色体DNAラダーの生成、核の凝縮といったアポトーシスの特徴が見られたほか、アポトーシスの実行に関与するとされるカスパーゼを阻害するカスパーゼ阻害剤によって、細胞死が抑制されることを見出した。更に、APP₆₉₅を高発現するグリオーマ細胞に抗APPモノクローナル抗体を作用させても細胞死が誘導されないことを見出した。抗APP抗体が直接神経細胞の細胞表面のAPPに作用し、APPのリガンド特異的な活性化により神経細胞の細胞死が誘導された事実は、膜結合型APPには、細胞死受容体としての生物学的な機能が備わっていることを示している。これらの事実から、本発明者らは、APPは、APPアゴニストにより神経細胞特異的にアポトーシスを誘導し、細胞死を引き起こしていることを明らかにした。

さらに、正常型APPではなく、家族性アルツハイマー病に見られるAPP₆₉₅の活性型変異体であるFAD-APPを発現誘導できる系の開発を行った。前述のように、これまで開発されたFAD-APPを発現する細胞株は一過性発現系であり、FAD-APPを発現する細胞の割合が低く、かつ変動するため、細胞死の詳しい解析や細胞死阻害剤等のスクリーニングには著しく不向きであった。仮に、刺激がなければ活性型変

異APPをほとんどまたは全く発現せず、外からの刺激により一斉に発現が誘導される細胞系が開発されれば、これらの問題を克服することができる。そこで活性型変異APPをコードするDNAをF11細胞に導入し、エクダイソンに応答してその発現を誘導することができる細胞系を新たに構築した。この系にエクダイソンを作用させ、その効果を検証したところ、活性型変異APPの発現が誘導され、これにより、一定時間内に大部分の細胞の細胞死を誘導できることが実証された。この細胞死は、F11/APP細胞における場合と同様、アポトーシスの特徴を示した。この事実は、また、膜結合型APPの活性化が、アルツハイマー病の病因となっていることを支持している。

上記の神経細胞死の誘導系は、APPアンタゴニストやAPPアゴニストのスクリーニングへの利用が可能である。これにより単離される化合物は、神経系疾患の予防や治療への応用が考えられる。

本発明は、APPの活性化による神経細胞の細胞死を誘導する方法、APPの活性化による神経細胞の細胞死の誘導剤および該誘導の阻害剤または促進剤、並びにこれらのスクリーニング方法およびスクリーニングのためのキットに関し、より具体的には、

- (1) 外来性のAPPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞、
- (2) APPがAPP₆₉₅である、(1)に記載の神経細胞、
- (3) F11細胞である、(1)または(2)に記載の神経細胞、
- (4) 外来性APPの発現によって細胞内全体のAPP発現量が、内因性APPの発現量の約20倍となっている、(3)に記載の神経細胞、
- (5) 活性型変異APPを誘導的に発現させることができ、該活性型変異APPの発現により細胞死が誘導されうる神経細胞、
- (6) 核内受容体をコードするDNAを含むベクターおよび該核内受容体の応答配列の下流に機能的に結合した活性型変異APPをコードするDNAを含むベクターを含

み、該核内受容体に対するリガンドの接触により該活性型変異APPの発現が誘導されうる、(5)に記載の神経細胞、

(7) 核内受容体がエクダイソン受容体であり、エクダイソン処理により活性型変異APPの発現が誘導される、(6)に記載の神経細胞、

(8) F11細胞である、(5)から(7)のいずれかに記載の神経細胞、

(9) APPの活性化による神経細胞の細胞死を誘導する方法であって、APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞に対し、APPの活性化を誘導する化合物を接触させる工程を含む方法、

(10) APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞が、

(1)から(4)のいずれかに記載の神経細胞である、(9)に記載の方法、

(11) APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞が、脳の皮質神経の初代培養細胞である、(9)に記載の方法、

(12) APPの活性化を誘導する化合物がAPPに結合する抗体である、(9)から(11)のいずれかに記載の方法、

(13) 抗体がAPPの細胞外領域に結合する抗体である、(12)に記載の方法、

(14) APPの活性化による神経細胞の細胞死を誘導する方法であって、(5)から(8)のいずれかに記載の神経細胞に対し、活性型変異APPを誘導的に発現させることができる化合物を接触させる工程を含む方法、

(15) APPの活性化による神経細胞の細胞死を誘導する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞に対し、被検試料を接触させる工程、

(b) 該神経細胞の細胞死を検出する工程、および

(c) 該神経細胞の細胞死を誘導する化合物を選択する工程、を含む方法、

(16) APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞が、

(1)から(4)のいずれかに記載の神経細胞である、(15)に記載の方法、

(17) APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞が、脳の皮質神経の初代培養細胞である、(15)に記載の方法、

(18) APPの活性化による神経細胞の細胞死の誘導を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞に対し、APPの活性化を誘導する化合物および被検試料を接触させる工程、

(b) 該神経細胞の細胞死を検出する工程、並びに

(c) 該神経細胞の細胞死の誘導を抑制する化合物を選択する工程、を含む方法、

(19) APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞が、

(1) から (4) のいずれかに記載の神経細胞である、(18)に記載の方法、

(20) APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞が、脳の皮質神経の初代培養細胞である、(18)に記載の方法、

(21) APPの活性化を誘導する化合物がAPPに結合する抗体である、(18)から(20)のいずれかに記載の方法、

(22) 抗体がAPPの細胞外領域に結合する抗体である、(21)に記載の方法、

(23) APPの活性化による神経細胞の細胞死の誘導を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) (5) から (8) のいずれかに記載の神経細胞に対し、活性型変異APPを誘導的に発現させることができる化合物および被検試料を接触させる工程、

(b) 該神経細胞の細胞死を検出する工程、並びに

(c) 該神経細胞の細胞死の誘導を抑制または促進する化合物を選択する工程、を含む方法、

(24) 神経細胞の細胞死を誘導する化合物または該誘導を阻害若しくは促進する化合物のスクリーニングのためのキットであって、(1) から (8) のいずれかに記載の神経細胞を含むキット、

- (25) APPの活性化による神経細胞の細胞死を誘導する化合物を有効成分とする、神経細胞の細胞死誘導剤、
- (26) APPの活性化による神経細胞の細胞死を誘導する化合物がAPPアゴニストである、(25)に記載の細胞死誘導剤、
- (27) APPアゴニストがAPPに結合する抗体である、(26)に記載の細胞死誘導剤、
- (28) APPに結合する抗体がAPPの細胞外領域に結合する抗体である、(27)に記載の細胞死誘導剤、
- (29) APPの活性化による神経細胞の細胞死の誘導を阻害する化合物を有効成分とする、神経細胞における細胞死の阻害剤、
- (30) APPの活性化による神経細胞の細胞死の誘導を阻害する化合物がAPPアンタゴニストである、(29)に記載の細胞死の阻害剤、
- (31) 神経細胞の細胞死に起因する疾病を予防または治療する薬剤である、(29)または(30)に記載の阻害剤、
- (32) 神経細胞の細胞死に起因する疾病がアルツハイマー病である、(31)に記載の阻害剤、に関する。

本発明は、APPの活性化による神経細胞の細胞死を誘導する方法を提供する。

本発明の細胞死の誘導方法の一つの態様は、APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞に対し、APPの活性化を誘導する化合物を接触させる工程を含む方法である。この方法に用いられる細胞としては、該細胞に存在するAPPの活性化によりその細胞死が誘導されうる神経細胞であれば特に制限はない。APP活性化剤を作用させた際に効率よく細胞死が誘導されるという観点から、APPをコードする外来性DNAが導入され、APPの発現レベルが高められた細胞を用いることが好ましい。APPを発現するためのベクターとしては、例えば、pcDNA (C.D. Funkら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5638-5642)、pECE (D.O. Morganら, 1987, Nature, 329: 301-307)、SR α (T. Takahashiら, 1996, Lab. Invest.,

74: 827-834)等を用いることができる。細胞へのベクターの導入は、例えばネオマイシン耐性遺伝子との共導入をリポフェクション法を用いて行い、選択された細胞をAPPの発現を指標に限界希釈法を用いてクローン化するという方法で、APPを過剰発現している神経細胞株を作成することができる。細胞におけるAPPの発現レベルは、APPの活性化による細胞死の誘導剤によって効果的に細胞死が誘導される限り制限はないが、例えば、外来性APPを発現する神経細胞株（例えば、F11細胞）を用いた場合には、内在性APPの2～100倍であることが好ましく、5～50倍であることがさらに好ましく、10～30倍であることがさらに好ましく、約20倍であることがさらに好ましい。APPの発現レベルは、用いるプロモーターや導入する遺伝子のコピー数などにより適宜調節することが可能である。

また、本発明においては、APPアゴニスト等のAPP活性化剤によって十分細胞死が誘導されるならば、外来性のAPPを発現する細胞のみならず、内在性のAPPのみを発現する細胞であっても用いることができる。例えば、脳の皮質細胞の初代培養細胞を用いることが可能である。また、本発明においては、内在性APPの発現を促進するために、レチノイン酸などの分化調節物質で処理した細胞を用いることもできる。

これらの細胞内で発現されるAPPは、正常型APPである。本発明において正常型APPとは、天然型APPのみならず、それと同等の機能を有する限り、変異を有しているAPPも含まれる。ここで「天然型APPと同等の機能」とは、天然型APPと同様に細胞死を誘導する機能のことをいう。

細胞内で発現させるAPPとしては、APP活性化剤処理により細胞死を誘導しうるAPPであれば特に制限はなく、種々のAPP（APPファミリー、APLP1およびAPLP2等を含む）を用いることが可能であると考えられる。APPファミリーとしては、例えば、マウス APP(K. Yoshioka et al., 1991, Biochem. Biophys. Res. Commun., 178: 1141-1146)、ヒト APLP2(W. Wasco et al., 1993, Nat. Genet., 5: 95-100)、マウス YWK-II(Y. C. Yan et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2405-2408)、

ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*) ALPP(D.R. Rosen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2478-2482)、マウス APLP1(S. Zhong et al., 1996, Genomics, 32: 159-162)等が挙げられる。好ましいAPPファミリータンパク質としては、APP₆₉₅が挙げられる。また、APPには野生型APPのみならず、変異を有するAPPも含まれる。

本発明において細胞死を誘導するためのAPP活性化剤としては特に制限はないが、例えば、APPを認識する抗体、好ましくはAPPの細胞外領域を認識する抗体を使用することができる。

本発明に用いられる神経細胞としては、例えば、神経系細胞、神経系細胞に由来する細胞および神経前駆細胞等が含まれる。例えば、神経芽細胞腫、褐色細胞腫、奇形腫、神経系細胞を用いた融合細胞および胎児性胚細胞等が含まれる。また、本発明においては、F11細胞、PC12細胞(L.A. Greeneおよび A.S. Tischler, 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 2424-2428)、NTERA2細胞(J. Skowronski および M. F. Singer, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6050-6054)、SH-SY5Y 細胞(L. Odelstad et al., 1981, Brain Res., 224: 69-82)等の神経細胞株を用いることも可能である。

本発明においては、APPの活性化剤処理により細胞死が誘導される限り、ヒト由来のAPPを発現する神経細胞に限定されず、例えば、他の哺乳類、両生類、魚類などの脊椎動物、ショウジョウバエ(*Drosophila*)、線虫(*Caenorhabditis elegans*)を含む無脊椎動物等、他の生物種のAPP (APPファミリーを含む)を発現する神経細胞を用いることも可能である。

本発明の細胞死の誘導方法において「細胞死が誘導される」とは、すべての細胞が細胞死を起こしている場合のみならず、有意に細胞死が誘導されている場合も含まれる。細胞死の誘導においては、APPの活性化剤を作用させた際に、最適な条件下で、好ましくは50%以上、更に好ましくは75%以上、最も好ましくは90%以上の細胞死亡率を示す。細胞の死亡率は、APPの発現量、APPアゴニスト

の種類や量、処理時間等によって変動しうる。有意な細胞死を誘導するためのAPPの発現量およびAPPアゴニストの種類や量は、当業者であれば適宜選択することができる。

本発明における細胞死の誘導においては、APPの活性化による細胞死の誘導剤が作用しなければ細胞死がほとんどまたはまったく誘導されず、該誘導剤が作用すると、有意に細胞死が誘導されることが好ましい。例えば、ラット後根神経節細胞初代培養とマウス神経芽細胞腫 N18TG2とのハイブリッド細胞であるF11細胞(D. Platikaら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3499; T. Yamatsujiら, 1996, Science, 272: 1349)にAPP₆₉₅を導入し、親細胞であるF11細胞の約20倍のAPP₆₉₅を発現する細胞は、APPアゴニストとして用いたモノクローナル抗体を作用させなければほとんど細胞死を起こさないが、該抗体を一定以上の濃度で作用させると、ほとんどの細胞の細胞死が誘導される。

本発明の細胞死の誘導方法の他の態様は、活性型変異APPを誘導的に発現させることができる神経細胞であって該活性型変異APPの発現により細胞死が誘導される神経細胞に対し、活性型変異APPを誘導的に発現させることができる化合物を接触させる工程を含む方法である。

本発明において「活性型変異APP」とは、リガンド非依存的にAPP活性を発現するようにアミノ酸配列が改変されたAPPを指す。すなわち、リガンド非存在下で神経細胞の細胞死を誘導する活性を有する変異APPである。このようなAPPとしては、家族性アルツハイマー型変異APP(FAD-APP)が挙げられる。FAD-APPとしては、APP₆₉₅の642位のValがIle、Phe、またはGlyに変異したもの、あるいは595位と596位のLysとMetがそれぞれAsnとLeuに2重変異したものが知られている。その他の変異であっても、活性型変異APPとしての活性を有する限り、本発明において用いることが可能である。活性型変異APPにおける変異は、自然界において生じたものでもよく、また人為的に導入したものであってもよい。また、活性型変異APPの由来は、ヒトに限定されない。本発明においては、種々の動物由来のAPPを用いることが可能で

ある。

活性型変異APPを誘導的に発現させることができる神経細胞は、種々の方法で調製することが可能である。例えば、誘導的プロモーターの下流に活性型変異APPをコードするDNAが結合したベクターを細胞内に導入する方法で調製することが可能である。例えば、メタロチオネインにより誘導されるメタロチオネイン誘導プロモーターや、テトラサイクリンにより誘導されるテトラサイクリン誘導プロモーター等を用いることができる。

また、活性型変異APPの発現を間接的に誘導するために、核内受容体を利用することも考えられる。この方法の一つの態様としては、まず、核内受容体をコードするDNAを含むベクターと該核内受容体の応答配列の下流に機能的に結合した活性型変異APPをコードするDNAを含むベクターを含む細胞を調製する。核内受容体はリガンドとの結合により転写因子として機能する性質を有するため、この調製した細胞にリガンドを作用させると、まず、リガンドと発現させた核内受容体が結合して複合体を形成する。次いで、この複合体が核内受容体の応答配列に結合し、転写因子として機能して該応答配列の下流の活性型変異APPをコードするDNAの発現を誘導する。この活性型変異APPの発現により、最終的に、活性型変異APPを発現した神経細胞の細胞死が誘導される。

この方法に用いられる核内受容体としては特に制限はないが、例えば、エクダイソン受容体が挙げられる(Shuman, S., 1994, J. Biol. Chem. 269: 32678-32684)。例えば、エクダイソンの結合により活性化されるエクダイソン受容体を、レチノイド X 受容体と共に予め細胞内で発現させ、エクダイソン応答配列の下流に活性型変異APP cDNAを挿入した遺伝子をさらに発現させるという手法を用いて細胞系を構築すれば、エクダイソンにより活性型変異APPを誘導的に発現させることができる。また、CreとloxPを組み合わせた誘導発現方式を用いることもできる。

この方法に用いられる神経細胞としては、上記したAPP活性化剤を用いた神経細胞の細胞死の誘導系の場合と同様である。

核内受容体や活性型変異APPの発現のためのベクターの作製や細胞への該ベクターの導入は、公知の遺伝子操作技術により行うことができる。

本発明の核内受容体の応答配列の下流に機能的に結合した活性型変異APPをコードするDNAを含むベクターにおいて「機能的に結合」とは、活性型変異APPをコードするDNAが、その発現が保証されるように核内受容体の応答配列の下流に結合していることを指す。

この活性型変異APPを利用した神経細胞の細胞死の誘導系において「細胞死が誘導される」とは、活性型変異APPの発現の誘導によって、すべての細胞が細胞死を起こしている場合のみならず、有意に細胞死が誘導されている場合も含まれる。細胞の死亡率は、活性型変異APPの種類や発現量、発現時間等によって変わりうるが、これらは適宜調節することができる。細胞死の誘導においては、活性型変異APPの発現の誘導によって、最適な条件下で、好ましくは50%以上、更に好ましくは75%以上、最も好ましくは90%以上の細胞死亡率を示す。

本発明は、また、APPの活性化による細胞死の誘導剤のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、上記のAPPの活性化による細胞死の誘導系において、細胞にAPP活性化剤に代えてAPPの活性化による細胞死の誘導活性を検出したい所望の被検試料を接触させ、該被検試料の細胞死誘導活性を検出し、該活性を有する化合物を選択する方法である。

即ち、このスクリーニング方法は、(a) APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞に対し、被検試料を接触させる工程、(b) 該細胞の細胞死を検出する工程、および、(c) 該細胞の細胞死を誘導する化合物を選択する工程、を含む。

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、精製タンパク質（抗体を含む）、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、土壌などの天然材料、放線菌ブローンスなどの細菌放出物質を含む溶液などが挙げられるが、これらに制

限されない。細胞への被検試料の接触は、被検試料の種類に応じて、被検試料の細胞培養培地への添加や被検試料の細胞内への導入（遺伝子導入も含む）などの方法で行うことができる。細胞死の検出は、実施例に記載の方法で行うことができる。検出の結果、有意な細胞死の誘導が認められれば、スクリーニングに用いた被検試料は神経細胞の細胞死誘導剤の候補であると判定される。

現在、APPの天然のアゴニストは知られていない。このスクリーニング系を用いれば、APPの天然のアゴニストをスクリーニングすることも可能である。例えば、被検試料として、脳由来のcDNA発現ライブラリーを用いれば、生体内でAPPのアゴニストあるいはリガンドとして働いているであろうタンパク質をコードする遺伝子を単離・同定することが可能である。

また、脳細胞の抽出液を被検試料としてこのスクリーニングを行い、細胞死誘導活性が検出された場合には、該被検試料を分画してさらにスクリーニングを行い、最終的に細胞死誘導活性を有する被検試料中の単一の化合物を特定することも可能である。

このスクリーニングにより得られた化合物の神経細胞の細胞死のシグナル伝達における作用点としては、種々考えられる。例えば、該化合物は、APPに直接作用しても、APPの上流または下流に作用してもよい。中でも、APPに直接作用して細胞死を誘導する化合物は、本発明においてAPPアゴニストと呼ぶ。APPアゴニストとしては、APPの活性化により細胞死が起こりうる細胞に作用させたときに、該細胞の細胞死が引き起こされるものであればいかなるものでもよい。例えば、APPの細胞外領域を認識する抗体は、APPアゴニストの候補になる。実施例に示すように、APP₆₉₅の細胞外領域を認識するモノクローナル抗体である α 1680抗体（実施例参照）やA1z90抗体（ベーリンガーマンハイム社；Code No.1381466）は、このような抗体に含まれる。抗体の形態には、特に制限はないが、好ましくはモノクローナル抗体が用いられる。モノクローナル抗体には、キメラ抗体、ヒト型抗体、およびヒト抗体などが含まれる。さらに、完全な形態の抗体のみならず、Fab断片、

F(ab')₂断片、シングルチェーンFv(scFv)なども含まれる。このような抗体は、当業者に公知の方法で調製することができる。これにより調製された抗体は、細胞死を誘導するためのAPPアゴニストとして用いられる。また、APPアゴニストはペプチドやその他の化合物であってもよい。APPアゴニストは天然化合物でも人工合成化合物でもよい。

また、本発明は、APPの活性化による神経細胞の細胞死の阻害剤のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法の一つの態様は、上記のAPPの活性化による細胞死の誘導系において、細胞にAPP活性化剤に加えてAPPの活性化による細胞死の誘導の阻害活性を検出したい所望の被検試料を接触させ、該被検試料の細胞死誘導の阻害活性を検出し、該阻害活性を有する化合物を選択する方法である。即ち、このスクリーニング方法は、(a) APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞に対し、APPの活性化を誘導する化合物および被検試料を接触させる工程、(b) 該細胞の細胞死を検出する工程、並びに(c) 該細胞の細胞死の誘導を抑制する化合物を選択する工程、を含む。孤発性アルツハイマー病に共通した特徴は、(1) APPに関連する細胞死であり、(2) そのAPPが非変異体であり、(3) 細胞死が神経特異的であるということである。このスクリーニングにおける神経細胞の細胞死は、これらの全ての特徴を満たすため、該細胞死は孤発性アルツハイマー病における神経細胞死の好適なモデルとなる。このためこのスクリーニングにより得られる化合物は、一般のアルツハイマー病治療薬のリードとなる可能性が高い。この系では、細胞死のS/N比が極めて高く、処理も簡便である。従って、この系はアルツハイマー病の拮抗薬を高速選択する、新規なハイスループットシステムとして利用することができる。

このスクリーニング方法の好ましい態様においては、APP₆₉₅ cDNA(I, Nishimoto ら, 1993, Nature 362: 75)を発現プラスミドに組み込み、神経細胞(例えばF11細胞)へ導入する。APP導入細胞を選択後、該細胞に、APPアゴニスト等のAPP活性化剤を作用させ、細胞死が効率的に誘導されることを確認する。このようにして

得た細胞に、被検試料存在下で該APP活性化剤を作用させ、細胞死誘導を抑制する化合物を選択する。

このスクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、精製タンパク質、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、土壌などの天然材料、アンチセンス核酸、リボザイムなどが挙げられるが、これらに制限されない。

細胞への被検試料の接触は、被検試料の種類に応じて、被検試料の細胞培養培地への添加や被検試料の細胞内への導入（遺伝子導入も含む）などの方法で行うことができる。細胞死の検出は、実施例に記載の方法で行うことができる。検出の結果、有意な細胞死の阻害が認められれば、スクリーニングに用いた被検試料は神経細胞の細胞死阻害剤の候補であると判定される。本発明の阻害剤としては、細胞死を完全には阻害できなくても、該阻害剤を添加しない場合に比べ、細胞死の比率を有意に低下させるものであればよい。

このスクリーニングにより選択される細胞死阻害剤の候補化合物の作用点は特に制限されず、APPに直接作用してもよいし、APPを介する細胞死のシグナル経路において、APPの上流または下流で作用してもよい。例えば、APPの上流に作用する化合物としては、APPを活性化するAPPアゴニスト等がAPPに結合することを阻害する化合物が挙げられる。また、該候補化合物は、APPに直接作用し、APPアゴニストの結合を阻害する化合物であっても、APPアゴニストがAPPに結合してもAPPを活性化できなくする作用を有する化合物であってもよい。また、APPより下流の細胞死シグナル伝達を遮断する化合物であってもよい。

また、本発明は、活性型変異APPを誘導的に発現させ細胞死を誘導する系を利用する、APPの活性化による神経細胞の細胞死の阻害剤または促進剤のスクリーニング方法に関する。前述のように、家族性ADには、APPの活性型変異が見られることから、この細胞系は家族性ADにおける神経細胞死の好適なモデルとなる。このスクリーニング方法は、（a）活性型変異APPを誘導的に発現させることができる神

神経細胞であって、該活性型変異APPの発現により細胞死が誘導されうる神経細胞に対し、活性型変異APPを誘導的に発現させることができる化合物および被検試料を接触させる工程、(b) 該細胞の細胞死を検出する工程、並びに (c) 該細胞の細胞死の誘導を抑制または促進する化合物を選択する工程、を含む。

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、精製タンパク質、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、土壌などの天然材料、アンチセンス核酸、リボザイムなどが挙げられるが、これらに制限されない。

細胞への被検試料の接触は、被検試料の種類に応じて、被検試料の細胞培養培地への添加や被検試料の細胞内への導入（遺伝子導入も含む）などの方法で行うことができる。細胞死の検出は、実施例に記載の方法で行うことができる。検出の結果、有意な細胞死の誘導の阻害が認められれば、スクリーニングに用いた被検試料は神経細胞の細胞死阻害剤の候補であると判定される。本発明の阻害剤としては、細胞死を完全には阻害できなくても、該阻害剤を添加しない場合に比べ、細胞死の比率を有意に低下させるものであればよい。一方、有意な細胞死の誘導の促進が認められれば、スクリーニングに用いた被検試料は神経細胞の細胞死促進剤の候補であると判定される。本発明の促進剤としては、該促進剤を添加しない場合に比べ、細胞死の比率を有意に増加させるものであればよい。

本発明のスクリーニングにより、APPのアンタゴニストや、APPの下流の細胞死シグナルを遮断する化合物を得ることができる。これらの化合物は、家族性ADに対する医薬品の候補となるのみならず、一般のADを含む種々の疾患に対する治療や予防に用いることが考えられる。また、本発明のスクリーニングにより、APPの細胞死シグナル伝達を亢進する化合物を得ることができる。また、このスクリーニング系を用いて、神経系に用いられる薬物の副作用を検証することができる。すなわち、上記スクリーニング系において、該薬物が神経細胞の細胞死を増悪させるような副作用があるか否かを決定し、そのような副作用を有する薬物を排除

するために使用することができる。

本発明の細胞死阻害剤は、APPが関与する細胞死等に起因する疾患の治療薬としても有用である。中でもAPPに結合し、APPの活性化を阻害する化合物は、本発明においてはAPPアンタゴニストと称する。APPアンタゴニストを用いれば、APPの活性化による細胞死を特異的に阻害することが可能となる。このような阻害剤は、APPの活性化に起因する種々の疾病に対する治療薬として特に有用である。

対象となる疾患としては、APPやその類縁分子に関連した細胞死の阻害が疾患の治療に有効である限り、特に制限されない。対象疾患としては、例えば、アルツハイマー病が挙げられる。これまでの研究から、アルツハイマー病において神経細胞の細胞死が起こることが明らかにされている(I. Nishimoto et al., 1997, Adv. Pharmacol., 41: 337-368)。この細胞死には、APPのある種の活性化が関与していることが示唆されている(I. Nishimoto et al., 1998, Neurobiol. Aging., 19: S33-S38)。このため、本発明の細胞死阻害剤は、アルツハイマー病における神経細胞の細胞死を阻害する薬剤として用いられることが期待される。また、該化合物を用いて、アルツハイマー病以外にも、例えば脳虚血による神経細胞の細胞死に起因する疾患を予防することも可能である(T. Kirino, 1982, Brain Res., 239: 57-69)。その他、痴呆を伴うパーキンソン病(M.H. Polymeropoulos et al., 1997, Science, 276: 2045-2047)、びまん性レービー小体(Lewy bodies)病(M.G. Spillantini et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 6469-6473)、ダウン症に伴う痴呆なども、治療や予防の対象となる。また、APPの類縁分子であるAPLP1が、先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子といわれている(Lenkkeri, U. et al., 1998, Hum. Genet. 102: 192-196)ことから、ネフローゼ症候群などの腎疾患も治療や予防の対象となる。

本発明の細胞死阻害剤がタンパク質または遺伝子である場合は、該タンパク質をコードするDNAまたは該遺伝子をcDNA等の形態で適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを標的細胞へ導入することにより、APPの活性化による細胞死を抑制す

ることができる。用いられるベクター系としては、当業者に公知の多くの系を用いることが可能である。

本発明の細胞死阻害剤は抗体でありうる。抗体の形態には特に制限はなく、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト型抗体、およびヒト抗体などの抗体を含む。さらに、完全な形態の抗体のみならず、Fab断片、F(ab')₂断片、シングルチェーンFv(scFv)などを含む。このような抗体は、当業者に公知の方法で調製することができる。これにより調製された抗体は、神経細胞死に起因する疾患の診断や抗体治療などに有用である。抗体治療に用いる場合には、免疫原性の観点から、ヒト化抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。

また、本発明の細胞死阻害剤がペプチドである場合には、細胞膜透過性を高めるために修飾されていてもよい。

神経細胞の細胞死を阻害または促進し得る上記化合物を医薬品として用いる場合には、これらの化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤などと適宜組み合わせる製剤化して投与することが考えられる。

患者への投与は、化合物の性質に応じて、例えば経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、静脈内、脊髄腔内、脳室内、または経口的に行われうる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

また、本発明は、神経細胞の細胞死を誘導、または該誘導を阻害または促進する化合物のスクリーニングのためのキットを提供する。神経細胞の細胞死を誘導

する化合物をスクリーニングするためのキットは、上記した外来性のAPPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞を含む。

また、神経細胞の細胞死の誘導を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニングのためのキットは、①上記の外来性のAPPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞、または②上記の活性型変異APPを誘導的に発現させることができ、該活性型変異APPの発現により細胞死が誘導されうる神経細胞を含む。

外来性のAPPを発現する神経細胞であって、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞をキットに含む場合には、キットにはさらに上記のAPPの活性化を誘導する化合物が含まれていてもよい。

また、キットに、活性型変異APPを誘導的に発現させることができ、該活性型変異APPの発現により細胞死が誘導されうる神経細胞として、核内受容体をコードするDNAを含むベクターおよび該核内受容体の応答配列の下流に機能的に結合した活性型変異APPをコードするDNAを含むベクターを含み、該核内受容体に対するリガンドの接触により該活性型変異APPの発現が誘導されうる細胞が含まれる場合には、キットには、さらに該核内受容体に対するリガンドが含まれていてもよい。

図面の簡単な説明

図1は、ウエスタンブロットによる、F11、F11/APP、およびBu695細胞のAPP₆₉₅の発現の解析を示す写真である。図中、1はAlz90抗体(5 μ g/ml)、2は α 1680抗体(0.5 μ g/ml)、3は22C11抗体(5 μ g/ml)を用いた結果を示す。

図2は、抗APP抗体処理したF11/APP細胞の細胞死の時間経過を示す図である。塗りつぶした記号は全細胞数を、白抜きは生細胞数を表す。丸は α 1680抗体(0.5 μ g/ml)処理、四角はAlz90抗体(1 μ g/ml)処理、三角は非特異的IgG(1 μ g/ml)処理の結果を表す。

図3は、抗APP抗体処理したF11/APP細胞の細胞死のタイムコースを示す図である。塗りつぶした記号はF11細胞を、白抜きはF11/APP細胞を表す。丸は α 1680抗

体($0.5\mu\text{g/ml}$)処理、四角はAlz90抗体($1\mu\text{g/ml}$)処理、菱形は非特異的IgG($1\mu\text{g/ml}$)処理の結果を表す。

図4は、F11/APP細胞の細胞死における、抗体吸収の効果を示す図である。抗原で予め抗体を吸収した α 1680抗体(吸収した α 1680)と、偽吸収した α 1680抗体(偽吸収した α 1680)による、F11/APP細胞の細胞死を示す図である。グラフの値は3~10回の独立した実験の平均と標準偏差(SD)を表す。また、吸収した α 1680抗体試料(レーン2)と、偽吸収した α 1680抗体試料(レーン1)をHRPラベルした抗ラットIgG抗体でウェスタン解析した結果を示す写真を挿入図に示す。図中、「重鎖」の位置が α 1680抗体に相当する。

図5は、F11/APP細胞における、精製抗APP抗体の用量依存性曲線を示す図である。 α 1680抗体(黒四角)、Alz90抗体(白四角)、Jonas抗体(黒丸)、および非特異的IgG(白丸)の各抗体を様々な濃度でF11/APP細胞に処理し、72時間後に細胞死を測定した。

図6は、抗APP抗体がF11/APP細胞の細胞死を誘導するときに考えられる2つのモデルを示す図である。左のモデルでは、抗APP抗体は細胞表面のAPPに作用して、細胞の細胞死機構を活性化する。右のモデルでは、抗APP抗体は可溶型APP(sAPP)を吸収して、その結果細胞死が起こる。図中「 \perp 」は阻害または抑制を表す。

図7は、F11/APP細胞の細胞死に関する、培地の交換(sAPPの除去)の効果を示す図である。12時間の間、1時間に1回培地を交換し、sAPPを除去することによる細胞死の誘導を調べた。上段に実験条件を模式的に示す。上段で、「72時間 Alz90」は、72時間Alz90抗体で処理したことを表す。「72時間 IgG」は、72時間非特異的IgGで処理したことを表す。「12時間洗浄」は、1時間に1回、計12回培地を交換したことを表し、「60時間 HamF-12」は、抗体を加えず、培地のみで60時間培養したことを表す。「12時間 Alz90」は、Alz90抗体で12時間処理したことを表す。この4種の条件で実験した結果を、下段のグラフに示した。

図8は、RMSQペプチドおよびSRQMペプチドの細胞死誘導能の検証を示す図であ

る。F11/APP細胞を、低濃度(10 nM)および高濃度 (100 nM)の各ペプチドで処理し、72時間後に細胞死を測定した。陰性対照(IgG ; 1 μ g/ml IgG)および、陽性対照(Alz90; 1 μ g/ml Alz90抗体)の結果も示した。

図9は、マイクロフィルターを有する挿入ウェルを用いた、細胞死誘導実験を示す図である。上段に実験条件を模式的に示した。左から、「IgG+ビーズなし」：ビーズを加えず非特異的IgGを加えた陰性対照、「Alz90抗体+ビーズなし」：ビーズを加えずAlz90抗体を加えた陽性対照、「Alz90抗体+プロテインGビーズ」：Alz90抗体を予めプロテインGビーズに結合させ、挿入ウェルに詰めた場合、「Alz90抗体+グルタチオンビーズ」：プロテインGビーズの代わりにグルタチオンビーズでAlz90抗体をインキュベートした対照、「グルタチオンビーズのみ」：グルタチオンビーズだけを挿入ウェルに詰めた対照。下段に細胞死測定の結果を示した。

図10は、図9における「IgG+ビーズなし」(IgG)、「Alz90抗体+ビーズなし」(Alz90)、「Alz90抗体+プロテインGビーズ」(Alz90+プロテインGビーズ)、および「Alz90抗体+グルタチオンビーズ」(Alz90+グルタチオンビーズ)処理した各ウェルに付着している細胞の代表的な位相差顕微鏡写真である。

図11は、抗APP抗体により細胞死が誘導されたF11/APP細胞のTUNEL染色像を示す写真である。「IgG」はF11/APP細胞を非特異的IgG(1 μ g/ml)で、また「 α 1680」は α 1680抗体(0.5 μ g/ml)で処理後24時間後の細胞をTUNEL染色した結果である。また「 α 1680+DEVD-CHO」は10 μ M Ac-DEVD-CHO存在下で α 1680抗体(0.5 μ g/ml)処理した結果、「UV」はF11/APP細胞をUV(320 μ J/cm²×10秒)で処理した結果である。明るい部分が、染色体DNAの断片化が起こっている核を表す。

図12は、DNAラダーの解析を示す写真である。Ac-DEVD-CHO非存在下(ー)または存在下(DEVD-CHO)、Alz90抗体(1 μ g/ml)で処理後24時間のF11/APP細胞を回収し、DNAラダーの生成を検出した。Ac-DEVD-CHOの濃度は左から0.1、1、10、および100 μ Mである。

図13は、抗APP抗体で誘導されたF11/APP細胞の細胞死における核の形態を示

す写真である。 α 1680抗体処理したF11/APP細胞のTUNEL染色の結果を表す。アポトーシスを表す核の凝縮(compaction)、切断(cleavage)、および断片化(fragmentation)が観察される。

図14は、抗APP抗体により誘導されるF11/APP細胞の細胞死における、テトラペプチド性カスパーゼ阻害剤の効果を示す図である。テトラペプチド非存在下(ー)または10 μ Mの各テトラペプチド存在下、F11/APP細胞を非特異的IgG抗体(1 μ g/ml)、 α 1680抗体(0.5 μ g/ml)、またはAlz90抗体(1 μ g/ml)で処理し、72時間後に細胞死を測定した。

図15は、APP₆₉₅を安定に過剰発現するグリオーマ細胞株Bu695における、抗APP抗体によるDNAラダー生成の有無の検証を示す写真である。Bu695細胞を1 μ g/mlの非特異的IgGまたはAlz90抗体(抗APP)で処理し、24時間後の細胞のDNAラダー生成のアッセイを行った。陽性対照として、Bu695細胞をUV(320 μ J/cm²×10秒)照射後24時間の試料(UV)をアッセイした。また、Alz90抗体処理したF11/APP細胞も対照としてアッセイした。

図16は、Bu695細胞のTUNEL染色を示す写真である。Bu695細胞を非特異的IgG(1 μ g/ml)(図中「IgG」)、Alz90抗体(1 μ g/ml)(図中「Alz90」)、または精製 α 1680抗体(0.5 μ g/ml)(図中「 α 1680」)で24時間処理し、TUNEL染色を行った。「UV」は、Bu695細胞をUV(320 μ J/cm²×10秒)照射した場合のTUNEL染色像を示す。同様の実験を3回行い、代表的な結果を示した。

図17は、皮質神経初代培養におけるAPP特異的抗体の効果を示す写真である。マウス初代培養皮質神経細胞を2 μ g/mlの非特異的IgG(a,c)またはAlz90抗体(b,d)で72時間インキュベートした。同様の実験と独立に4回行い、代表的な結果を位相差顕微鏡写真を a および ^{b?} に示した。また、同様に処理した細胞をHoechst 33258 で染色した結果を ^{c?} および d に示した。 a および c はそれぞれ、 b および d と同じ倍率である。

図18は、APP特異的抗体で処理した皮質神経初代培養のTUNEL染色の結果を示

す写真である。皮質神経初代培養を10 μ MのAc-DEVD-CHOまたは細胞非透過性Ac-DEVDの存在下または非存在下で、2 μ g/mlの非特異的IgGまたはAlz90抗体と共に24時間インキュベートした。その後、TUNEL染色によりDNAの断片化を解析した。同様の実験を独立して3回行い、代表的な結果を示した。

図19は、FAD-APP発現誘導細胞におけるAPP₆₉₅ (V642I)の発現を示す写真である。F11/EDXR/V642I細胞を20 μ M Muristerone (Invitrogen) 存在下(+)または非存在下(-)で48時間培養し、抗Alz90抗体 (5 μ g/ml) でイムノブロッティングを行った。少なくとも8回の実験の典型的な結果を示す。

図20は、F11/EDXR/V642I細胞を、10 μ M Ac-DEVD-CHO存在下(+)または非存在下(-)の条件のもとで、20 μ M エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で48時間培養した結果を示す図である。細胞死比率を、トリパンブルー排除アッセイで測定した。少なくとも8回の実験の典型的な結果を示す。

図21は、20 μ M Muristerone 存在下(下段)または非存在下(上段)で48時間培養したF11/EDXR/V642I細胞の顕微鏡写真である。少なくとも8回の実験の典型的な結果を示す。

図22は、F11/EDXR/V642I細胞を20 μ M Muristerone 存在下(下段)または非存在下(上段)で48時間培養し、Hoechst 33258で染色した染色像を示す写真である。少なくとも8回の実験の典型的な結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら制限されるものではない。

[実施例1] 抗APPモノクローナル抗体

モノクローナル抗体である α 1680抗体は、以下のようにして作成した。APP 1-591を含むBglII断片 (I. Nishimoto et al., 1993, Nature, 362: 75-79) を、GSTタンパク質を含む発現ベクター (F. Eckhardt et al., 1997, Mol. Cell. Neurosci.,

9: 409-419) に組み込み、大腸菌 (DH5 α) へ形質転換して、GST融合APP1-591タンパク質を生産させた。グルタチオンビーズを用いて組換えタンパク質を精製・回収した(J.V. Frangioniおよび B.G. Neel, 1993, Anal. Biochem. 210: 179-187)。このGST融合APP1-591タンパク質を抗原に用いて、公知の方法でモノクローナル抗体を作製した(C.J. Barnstable et al., 1978, Cell, 14: 9-20)。

α 1680抗体はAPPの細胞外領域の大部分を占めるAPP1-591を特異的に認識するが、組換えGSTは認識しないことが確認された。本発明において特に断らない限り、 α 1680抗体溶液とは、 α 1680抗体濃度が5 μ g/mlのハイブリドーマ培養液の1/10希釈を指す。また、Alz90抗体は、APPの細胞外領域の511-608残基に対するマウスモノクローナルIgG(ベーリンガー・マンハイム社; Code No.1381466)である。

[実施例2] APPを発現する神経細胞の作製

神経細胞として、F11細胞を用いた。F11細胞は、第1後根神経節の神経細胞と神経芽腫細胞株N18TG2とのハイブリッドで、神経細胞としての特性を保持している(D. Platikaら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3499; T.Yamatsujiら, 1996, Science, 272: 1349)。F11細胞の培養には、18%ウシ胎児血清を含むHamF-12培地(ギブコ社)を用いた。APP₆₉₅ cDNA(I. Nishimotoら, 1993, Nature, 362: 75)を含むHindIII-BamHI断片を発現ベクターpcDNA (C.D. Funkら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5638-5642)へ組み込み、ピューロマイシン耐性遺伝子を含むpBabe/puro (H. Zhao et al., 1996, J. Invest. Dermatol. 106: 744-752)と共にリポフェクション法を用いてF11細胞にトランスフェクションした。リポフェクションはAPP cDNA 9 μ g、pBabe/puro 1 μ g、リポフェクタミン(ギブコ社) 10 μ lを用い、文献(T. Okamotoら, 1996, EMBO J., 15: 3769)に記載の方法に従い行った。細胞は、14 μ g/mlのピューロマイシンで選択し、4~5週間後、耐性コロニーを回収し、5 μ g/mlの抗APPモノクローナル抗体22C11(T. Okamotoら, 1995, J. Biol. Chem., 270: 4205)でイムノプロット解析を行い、APPの発現レベルが高いコロニーを限界希釈によりサブクローニングした。

単離された、APP₆₉₅を安定に発現するAPP導入F11細胞(F11/APP)を培養し、F11/APP、親細胞であるF11、およびBu695細胞(実施例9参照)の細胞ホモジェネート(それぞれ50 μ gタンパク質)を10%SDS-PAGEに供し、Alz90抗体(5 μ g/ml; 図1パネル1)、 α 1680抗体(0.5 μ g/ml; パネル2)、または22C11抗体(5 μ g/ml; パネル3)を用いてイムノブロッティングを行った(図1)。その結果、F11/APP細胞は、APP₆₉₅タンパク質を高発現しており、その発現量は親細胞であるF11細胞に比べて約20倍であった。

使用した3種の抗APP抗体は、それぞれ認識するAPPの部位が異なっているが、F11/APP細胞とBu695細胞では、どの抗体でも同程度のシグナルが検出された(図1)。(なお、F11細胞において、 α 1680抗体を用いたイムノブロット解析でのみ観察された、90~100kDaのバンドは再現性がなかった。)

[実施例3] APP₆₉₅導入神経細胞の細胞死誘導

APP₆₉₅を導入したF11/APP細胞およびF11細胞を、 α 1680抗体またはAlz90抗体で処理する実験を行った。 α 1680抗体は、APP₆₉₅タンパク質の細胞外ドメインの主要な領域であるAPP1-591に対するモノクローナル抗体である。

F11/APP細胞を、18%ウシ胎児血清を含むHamF-12培地中でディッシュに播き、24時間後に洗浄の後、 α 1680抗体(0.5 μ g/ml)、Alz90抗体(1 μ g/ml)、または非特異的IgG(1 μ g/ml)を含むHamF-12培地に培地を交換した。その後、様々な時間における細胞の生存数を、トリパンブルーの排除を指標に測定した。細胞は洗浄せず、穏やかにピペッティングして血清を含まない培地に懸濁し、PBSに溶かした0.1%トリパンブルーを細胞懸濁液に最終濃度0.02%となるように加え、37°Cで15分間インキュベートした後、トリパンブルーの排除を指標にすることにより計測した(図2)。また、図2と同様の実験をF11/APP細胞およびF11細胞を用いて行い、その結果を基に細胞の死亡率を(100-細胞生存率)(%)で表した(図3)。

その結果、図2および3に示すように、抗体処理後72時間後に、抗体処理したF11/APP細胞の80~90%が細胞死を起こした。処理後24時間後では、死んだ細胞は

ほとんど観察されなかったが、処理後48時間後には、その数が顕著に増加し始めた。APP₆₉₅を安定にトランスフェクトしたF11細胞で図2および3に示した細胞とは異なる細胞を用いて同様の実験を行った結果、 α 1680抗体による細胞死のタイムコースおよび細胞死の程度は図2および3と同様であった。それに対して、非特異的IgGで処理したF11/APP細胞は、処理後72時間後でもほとんど細胞死は誘導されなかった(図2および3)。図2の非特異的IgG処理において、処理後細胞数が増加し、処理前よりも飽和細胞数がわずかに増加しているが、これは培地を新鮮な培地に交換したことに起因する。また、親細胞であるF11細胞を α 1680抗体で処理しても、細胞死はほとんど誘導されなかった(図3)。再現性を確認するために、図2および3に示した実験と同様の処理を、独立に3回以上繰り返したが、いずれの場合も同様の結果を得た。

[実施例4] 細胞死誘導における α 1680抗体特異性の確認

実施例3における α 1680抗体による細胞死誘導が、 α 1680抗体特異的であることを確認するため、以下の実験を行った。大腸菌組換えGST融合APP1-591タンパク質をグルタチオンセファロースと混合し、室温で8時間インキュベートし、GST融合APP1-591をグルタチオンビーズに固定化した。APP1-591を結合させたグルタチオンビーズと、結合させていないグルタチオンビーズ(それぞれ500 μ l/チューブ)を、5 μ g/mlの α 1680抗体溶液と混合し、室温でさらに8時間インキュベートした。ビーズを遠心して沈殿させ、上清を回収して、実施例3と同様に、得られた抗体液を10倍希釈してF11/APP細胞へのアッセイに用いた。APP1-591を結合させたグルタチオンビーズとインキュベートした抗体を「吸収した α 1680」、対照のグルタチオンビーズとインキュベートした抗体を「偽吸収した α 1680」とした。1/10希釈した、「吸収した α 1680」または「偽吸収した α 1680」をF11/APP細胞の培地に添加し、72時間後に細胞の死亡率を測定した(図4)。図4のグラフの値は3~10回の独立した実験の平均と標準偏差(SD)を表す。上清の一部は膜に転写し、ブロッキングの後に、HRPラベルした抗ラットイムノグロブリン抗体を用いてイム

ノブロット解析を行った(図4挿入図)。シグナルの検出にはECLウエスタンブロットティング検出システム(アマシャム社)を用いた。図4の挿入図の中で、レーン1が「偽吸収した α 1680」、レーン2が「吸収した α 1680」に対応する。

図4からわかるように、「偽吸収した α 1680」抗体は、吸収しない α 1680抗体と同様の細胞死誘導活性を示したが、「吸収した α 1680」抗体は、ほとんど細胞死を誘導しなかった。また、イムノブロット解析の結果、吸収をかけた抗体試料は効率よく抗体が吸収されていることが確認された(図4挿入図レーン2)。以上の結果から、F11/APP細胞の細胞死を誘導したのは α 1680抗体であり、抗体が含まれるバッファーや、その他の混入物によるものではないことが確認された。

[実施例5] APPの細胞外領域に対する抗体の重要性の検証

APPタンパク質の異なる領域に対する抗体を用いて、細胞死誘導活性における抗体の認識領域の重要性を検証した。精製抗APP抗体として、 α 1680抗体、Alz90抗体、およびJonas抗体(ベーリンガー・マンハイム社; Code No.1584944)を使用した。Jonas抗体は、APP₆₉₅の細胞内領域である643-695残基に対して作られたマウスモノクローナル抗体である。

F11/APP細胞培地を、様々な濃度の精製抗APP抗体を含むHamF-12培地に交換する処理を行い、処理後72時間後に細胞の死亡率を測定した。その結果、 α 1680抗体は最も高い効率でF11/APP細胞の細胞死を引き起こし、その効率は最大90%以上であった(図5)。0.5 μ g/mlの抗体処理後72時間でF11/APP細胞の大多数が細胞死を起こした。Alz90抗体は、細胞死を引き起こす能力は約半分であった。Alz90抗体1 μ g/mlの処理で、処理後72時間後に約90%の細胞が細胞死を起こした。Alz90抗体によって誘導される細胞死のタイムコースは、本質的には α 1680抗体によるものと同様であった(図5)。同じ条件において、親細胞であるF11細胞では、 α 1680抗体でもAlz90抗体でも細胞死を起こすことはできなかった。また、APP₆₉₅の細胞内領域中の643-695残基に対する抗体であるJonas抗体を試験したところ、結果はAPPの細胞外領域に対する抗体を用いた場合とは対照的であり、1 μ g/mlまで

の濃度において、F11/APP細胞の細胞死はほとんど誘導されなかった（図5）。また、親細胞であるF11細胞も、Jonas抗体によって細胞死は誘導されなかった。これらの結果から、抗APP抗体によるAPP発現細胞の細胞死は、抗体がAPPの細胞外領域に対して作用するためであることが確認された。

〔実施例6〕 抗APP抗体の作用機構の検証

<1>

APPは膜結合型蛋白として発現した後、通常の代謝によって、APPの細胞外領域が可溶型APP(sAPP)として細胞外に分泌されるといわれている。実施例5の結果から、抗APP抗体は、細胞表面で発現しているAPP₆₉₅タンパク質の細胞外領域に結合することによってF11/APP細胞の細胞死を誘導している可能性が高い（図6左）。この場合、抗APP抗体は細胞表面のAPPに作用し、細胞質にある細胞死機構を活性化する。しかし、別の可能性として、F11/APP細胞から分泌された可溶型APP(sAPP)が細胞死から保護する機能を有する一方、抗APP抗体がsAPPを吸収することによって、細胞死が引き起こされるという可能性も考えられる。この場合、抗APP抗体は可溶型APP(sAPP)を吸収し、sAPPが不活性化されるために細胞死が誘導され、結局、抗体依存的にF11/APP細胞の細胞死が誘導されることになる（図6右）。上記の2つの可能性において、APPは逆の機能を果たすことになる。図6左では、APPは細胞死の機構を活性化するが、図6右では、APPは神経保護系の機能に関わっている。

後者の可能性に関して、sAPPが神経保護効果を有するという報告がある（J.M. Rochら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 7450; L.W. Jinら, 1994, Neurosci., 14: 5461）。しかしながら、図6右に示した可能性は、除外されると考えられる。その理由の1つは、UV照射などの細胞死を誘導する刺激を与えた場合に、APPを過剰発現するF11細胞において、生存率の上昇が見られなかった（図16に示したF11/APP細胞へのUV照射と同様の実験を親細胞であるF11細胞に対し行った結果、F11/APP細胞と同様に、24時間後ほとんどの細胞がアポトーシスを起こした）ことであり、もう1つの理由は、APP過剰発現細胞は、血清飢餓により細

胞死が高率で起こることである（例えば図3において、非特異的IgG処理を行った場合、血清が存在しない状態では、F11細胞よりも細胞死が高率で起こっている）。

前記の後者の可能性をさらに検討するために、以下のような一連の実験を行った。

< 2 >

まず、培地を繰り返し洗うことにより可溶因子を除去して、その効果を観察した。F11/APP細胞培地を、血清を含まないHamF-12培地に交換し、最初の12時間は、1時間に1回交換し、その後、血清を含まないHamF-12培地で60時間インキュベートした（図7；12時間洗浄）。細胞死は、実験開始72時間後に測定した。また、F11/APP細胞を1 μ g/mlのAlz90抗体を含むHamF-12培地で12時間（図7；12時間Alz90）または全72時間（図7；72時間Alz90）インキュベートする実験、そして1 μ g/mlの非特異的IgGを含むHamF-12培地で72時間（図7；72時間IgG）インキュベートする実験を行った。図7上に実験条件を図示した。

F11/APP細胞をAlz90抗体を含むHamF-12培地で最初の12時間処理した後、抗体を含まないHamF-12培地に交換し、さらに60時間培養したところ、F11/APP細胞の大半で細胞死が誘導され、その程度はAlz90抗体で72時間処理したときと同様であった。従って、Alz90抗体による12時間の処理は、抗APP抗体がF11/APP細胞の細胞死機構を働かせるのに十分であることがわかった。仮に、抗APP抗体による細胞死が、培地中のsAPPの吸収によるものであるとすれば、この結果はsAPPを最初の12時間除去すれば、細胞死が誘導されることを意味している。そこで、最初の12時間の間、1時間に1回の割合で計12回培地を交換し、その後抗体を含まないHamF-12培地で60時間培養した。この操作によって、最初の12時間の間、全ての可溶型APP(sAPP)の効果を最小限にすることができる。実験開始72時間後、F11/APP細胞の細胞死の比率は、非特異的なIgGによって誘導される基礎的な比率と比べて、ごく僅かしか上昇せず（図7）、細胞死を起こした細胞は、抗APP抗体で12時間処理したものに比べると、比較にならないほど少なかった。

これらの結果は、抗APP抗体によるF11/APP細胞の細胞死が、可溶型APP(sAPP)の除去によって引き起こされているものではないことを示している。(なお、12時間洗浄により細胞死のレベルが僅かに上昇したのは、繰り返し培地を交換したことによる細胞へのダメージによるものと考えられる。)

< 3 >

次に、sAPPのインヒビターと報告されているペプチドの効果を検証した。APP₆₉₅の細胞外領域の中にある配列に対応するR³³⁰MSQ³³³ペプチドは、10nMの濃度でsAPPの神経保護効果を無効にすると報告されている(H. Ninomiyaら, 1993, J. Cell Biol., 121: 879)。仮に、抗APP抗体がsAPPを不活性化させることにより細胞死を誘導しているのであれば、培地中にこのRMSQペプチドを加えることによって、似たような効果を引き起こすことが期待される。そこで、F11/APP細胞を低濃度(10 nM)または高濃度(100 nM)のRMSQペプチド、またはSRQMペプチドを培地に添加して72時間インキュベートし、細胞死を測定した(図8)。RMSQペプチドおよびその配列をスクランブルしたSRQMペプチドは、合成後、95%以上の純度にしたものを用いた。図8の左の2つのカラムは、陰性対照(1 μ g/ml 非特異的IgG)と陽性対照(1 μ g/ml Alz90抗体)である。

図8に示されたように、RMSQまたはSRQMのどちらも、100 nMまでの濃度においてF11/APP細胞の細胞死を誘導できなかった。この結果もまた、抗APP抗体の細胞死の効果がsAPPの遮断によるものではないことを示している。

< 4 >

抗APP抗体が、細胞表面のAPPに直接作用することを確認するために、Alz90抗体をF11/APP細胞からは隔離しておき、培地中のsAPPには接触できるようにして実験を行った。この目的のため、Alz90抗体(最終濃度1 μ g/ml)をプロテインG結合セファロース(ファルマシア社)とブレインキュベートし、底にマイクロポア膜を有する挿入ウェルの中に詰めた。挿入ウェルは、底面にF11/APP細胞を培養している24ウェルプレート上にはめ込んだ。実験の概要を図9上に示す。抗体が結合した

ビーズが可溶型APPと十分に接触するように、最初の24時間は、CO₂インキュベーター中でゆっくり(1 rpm)培養プレート揺らし続けた。72時間後、挿入ウェルの外に出て、細胞を培養している24ウェルプレートに検出されたビーズはなかった。

インキュベート開始から72時間後、この挿入ウェルがあるF11/APP細胞は、ほとんど細胞死が誘導されなかった(図9、10)。それに対して、ビーズがない挿入ウェルに同じ最終濃度のAlz90抗体を単に加えた対照では、F11/APP細胞の大半が細胞死を起こした。また、抗体を捕捉することができないグルタチオンセファロース(ファルマシア社)とインキュベートしたAlz90抗体(最終濃度1 µg/ml)を詰めた対照の挿入ウェルと共に培養したF11/APP細胞の多くは細胞死を起こし、ビーズがない挿入ウェルに単にAlz90抗体を加えた場合と同様の細胞死の比率を示した。また、挿入ウェルにグルタチオンセファロースや非特異的IgG(最終濃度1 µg/ml)を加えた場合は、細胞死はほとんど観察されなかった。

実験に用いた挿入ウェルの膜は、3 µmのサイズのポアを有するため、可溶性タンパク質はAlz90抗体が結合したビーズに接触することができる。しかし、実験に用いたビーズはポアを通過できないため、この条件ではビーズに結合したAlz90抗体はF11/APP細胞へ作用することはできない。実際、Alz90抗体/プロテインGセファロースを詰めた挿入ウェルとともにインキュベートした培養上清には、Alz90抗体は検出されなかったが、Alz90抗体/グルタチオンセファロースを詰めた挿入ウェルと共にインキュベートした培養上清には、ビーズのない挿入ウェルに単にAlz90抗体を加えた場合とほぼ同量のAlz90抗体が含まれていた。これらの結果は、抗APP抗体が細胞表面のAPPに直接相互作用することが、細胞死の誘導に必要なことを示している。

実施例6の結果を考え合わせると、これらの抗APP抗体はAPPのアゴニスティックなリガンドとして機能し、細胞表面のAPPに直接作用して神経細胞の細胞死を起こしていると結論される。

[実施例7] F11/APP細胞の細胞死の解析

< 1 >

抗APP抗体により誘導されるF11/APP細胞の細胞死の特徴を解析するために、TUNEL染色法を用いてDNAの断片化を検出した。TUNELアッセイに用いる細胞は、ポリDリジンでプレコートされたスライドガラスに播き、18%ウシ胎児血清と抗生物質を含むHamF-12培地で予め培養した。抗体の処理は、実施例6と同様に血清非存在下で行った。

F11/APP細胞に対し、非特異的IgG(1 μ g/ml)または α 1680抗体(0.5 μ g/ml)を培地に添加して24時間処理し、TUNEL法(Y. Gavrieli et al., 1992, J. Cell Biol., 119: 493-501)により、試料をFITCラベルしたdUTPで染色した。また、F11/APP細胞を、10 μ MのAc-DEVD-CHO (Peptide Inc.製) 存在下で α 1680抗体(0.5 μ g/ml)で同様に処理して、同様にTUNEL染色を行った。さらに、F11/APP細胞に紫外線(UV)照射(320 μ J/cm²×10秒間)を行って、同様にTUNEL染色を行った(UV照射によって細胞にアポトーシスが誘起される)。実験は最低3回行い、得られた結果の代表例を図11に示した。

F11/APP細胞を非特異的なIgGで処理した場合には、処理した細胞の核のTUNEL陽性のシグナルは事実上観察されなかった(図11; IgG)。それに対して、UV照射では、照射を受けたほとんど全てのF11/APP細胞でDNAの断片化が起こった(図11; UV)。細胞を α 1680抗体で処理した場合、処理後24時間後には、80~90%の細胞の核で、DNAの断片化が観察された(図11; α 1680)。さらに、細胞透過性の細胞内カスパーゼ(caspases)阻害剤であるAc-DEVD-CHOが、 α 1680抗体によるDNA断片化を阻害した(図11; α 1680+DEVD-CHO)(カスパーゼはアポトーシスに分類される細胞死の進行に関与しているといわれている(E.S. Alnemri, 1997, J. Cell. Biochem., 64: 33-42))。このことは、抗APP抗体はF11/APP細胞において、クロマチンの断片化を引き起こす、カスパーゼが関与する遺伝的に規定されたアポトーシスに分類される細胞死のプログラムを活性化していることを示唆している。

< 2 >

さらに、同様に、 α 1680抗体を培地中に添加し24時間のインキュベーションによる処理を行い、F11/APP細胞のDNAラダー(ladder)の生成を、Ac-DEVD-CHOの存在下または非存在下で調べた。抽出されたDNAに180bpサイズのラダーが検出されることは、アポトーシスを定義づけるための基本的な特徴の1つである(A.H. Wyllie, 1980, Nature, 284: 555)。DNAラダーアッセイは、ApopLadder Exキット(Takara社)を用いて、説明書に従って行った。

F11/APP細胞を、Ac-DEVD-CHOの非存在下(図12; (-))または、様々な濃度の存在下で、Alz90抗体($1\mu\text{g/ml}$)を培地中に添加し24時間のインキュベーションによる処理を行い、DNAラダー生成アッセイを行った。Ac-DEVD-CHOの濃度は、図中左からそれぞれ0.1、1、10、および $100\mu\text{M}$ である。

図12に示すように、F11/APP細胞を α 1680抗体で処理すると、DNAの180bpラダーが生成し、このラダー生成はAc-DEVD-CHOにより阻害された。Ac-DEVD-CHO濃度を高くするほど、DNAラダー生成は強く抑制された。これらのデータから、抗APP抗体が誘導するDNAの断片化はアポトーシスであることが示された。

< 3 >

また、 α 1680抗体で処理したF11/APP細胞におけるTUNELで染色された核の形態を観察した。処理後24~36時間で、ほとんど全ての細胞において、凝縮(compaction)、切断(cleavage)、または断片化(fragmentation)といった核の形態変化が起きた。これらは全て、アポトーシスによる核の変化の定義と一致する。図13に、TUNEL法で染色した、 α 1680抗体処理F11/APP細胞の核を示す。図中には、アポトーシスを起こした細胞の核に典型的に見られるさまざまな特徴、すなわち核の凝縮(compaction)、切断(cleavage)、および断片化(fragmentation)等が示されている。このような形態変化が起こる正確なタイミングは、実験により変化した。通常、抗APP抗体で処理後24~36時間の間に誘導された。

[実施例8] カスパーゼ阻害剤の効果

次に、F11/APP細胞を、10 μ MのAc-DEVD-CHOまたはAc-DEVD(C末端のアルデヒド修飾なし)(DEVD-AMC, カスパーゼインビトロ基質アッセイ用, Peptide Inc.)の存在下または非存在下で、1 μ g/mlの非特異的IgGまたはAlz90抗体を培地に添加し72時間処理し、トリパンブルーで細胞死を測定した。Ac-DEVD-CHOとは異なり、Ac-DEVDは細胞膜を透過しないため細胞内に作用しない。そのためカスパーゼを阻害せず、アポトーシスを抑制しない。10 μ MのAc-DEVD-CHOまたはAc-DEVD単独の処理も、陰性対照として行った。その結果を表1に示す。数値は最低5例の平均 \pm SDを表す。表中、「*」はスチューデントのt検定において、有意水準1%で、Alz90抗体で誘導される細胞死が抑制されたと言えることを、また「§」はそれが言えないことを表す。

[表1]

F11/APP細胞の細胞死 (%)	
IgG	5.0 \pm 0.5
Alz90	87.0 \pm 2.0
Alz90+Ac-DEVD-CHO	25.0 \pm 6.4*
Alz90+Ac-DEVD	79.0 \pm 5.2§
Ac-DEVD-CHO	7.2 \pm 1.8
Ac-DEVD	7.0 \pm 1.5

Alz90抗体によるF11/APP細胞の細胞死は、10 μ MのAc-DEVD-CHOで顕著に抑制された(表1)。この結果から、Ac-DEVD-CHOは、 α 1680抗体の場合と同様に、Alz90抗体によって引き起こされるF11/APP細胞のアポトーシスも抑制することが確認された。それとは対照的に、C末端のアルデヒド修飾がない、細胞非透過性のAc-DEVDは抗体により誘導される細胞死に対する拮抗効果は観察されなかった(表1)。

これらの結果から、DEVDペプチドの抑制効果は細胞内の標的を介していることが示された。

さらに、他の抗カスパーゼテトラペプチドが、抗APP抗体による細胞死を抑制できるか、もし抑制できるなら、Ac-DEVD-CHOと比べた場合の抑制強度はどの程度かを調べた。以下に示すテトラペプチドは、特異的なカスパーゼを抑制することがわかっている。

Ac-YVAD-CHO(Peptide Inc.): カスパーゼ 1 ファミリー阻害

Ac-VEID-CHO(Peptide Inc.): カスパーゼ 6 阻害

Z-IETD-CHO (MBL社): カスパーゼ 6 および 8 阻害

それに対してAc-DEVD-CHOは、ほとんど全てのカスパーゼを阻害し、特にカスパーゼ 3 ファミリーに最も高い親和性を有している。本発明者らは、F11/APP細胞を、10 μ Mの各テトラペプチドの存在下、非特異的IgG、 α 1680抗体(0.5 μ g/ml)、またはAlz90抗体(1 μ g/ml)を培地に添加する処理を行い、トリパンブルーで細胞死を測定した(図14)。テトラペプチドは全て、末端にアルデヒド残基を有するものを用いた。その結果、どのペプチドも抗APP抗体で誘導される細胞死を阻害し、その阻害の強さは、DEVD>YVAD>VEID>IETDの順であった(図14)。

既知のカスパーゼ単独で、テトラペプチドにより同様のプロフィールで阻害を受けるものは知られていない。これらのデータから、ここで用いられた抗体により誘導される細胞死には、少なくとも2種類のカスパーゼ、あるいは新規のカスパーゼが関与していることが示され、また実施例7で示された、抗APP抗体がアポトーシスを触発しているということに一致した。また、この結果から、 α 1680抗体が誘導するF11/APP細胞の細胞死を遮断するテトラペプチドの特性は、Alz90抗体が誘導する細胞死を遮断するテトラペプチドの特性と同じであることを示している。これらのデータは、両者の抗体は、APPという共通の標的抗原により触発される同一の細胞内メカニズムを介して細胞死を引き起こすことを示す証拠であると言える。

[実施例 9] APPにより誘導される細胞死の組織特異性

抗APP抗体により誘導される細胞死の組織特異性を明らかにするために、抗APP抗体の細胞死効果を他のタイプの細胞で調べた。このとき、異なるタイプの細胞においても、APP₆₉₅がF11/APP細胞とほぼ同量発現するものを用いた。F11細胞の内在性APPは、細胞死を起こすには不十分であったことからわかるように、APPの発現レベルは、抗APP抗体による細胞死効果を決定する主要な細胞因子の1つである。このため、本発明者らは、APP₆₉₅を安定に発現するグリオーマ細胞株Bu-17のクローンであるBu695細胞(Y. Hayashiら, 1992, Biochem. Biophys. Res. Commun., 187: 1249)を用いた。イムノブロット解析から、Bu695細胞はF11/APP細胞とほぼ同量のAPP₆₉₅を発現することが確認された(図1)。

この細胞を用いて、実施例8と同様に、10 μ MのAc-DEVD-CHOまたはAc-DEVD(C末端の修飾なし)の存在下または非存在下で、1 μ g/mlの非特異的IgGまたはAlz90抗体で72時間処理し、トリパンブルーで細胞死を測定した結果を表2に示す。このとき、10 μ MのAc-DEVD-CHOまたはAc-DEVD単独の処理も、陰性対照として行った。数値は最低5例の平均 \pm SDを表す。

[表 2]

Bu695細胞の細胞死 (%)	
IgG	5.2 \pm 1.0
Alz90	5.8 \pm 2.0
Alz90+Ac-DEVD-CHO	6.2 \pm 1.6
Alz90+Ac-DEVD	5.7 \pm 2.3
Ac-DEVD-CHO	5.6 \pm 1.0
Ac-DEVD	7.6 \pm 1.5

その結果、F11/APP細胞では高度に細胞死が誘導されるような濃度のAlz90抗体で処理しても、Bu695細胞では、非特異的IgGで処理した結果と比較して、細胞死を増加させることはできなかった（表2）。

また、Bu695細胞の抗APP抗体によるDNAの断片化効果を調べるため、Bu695細胞を $1\mu\text{g/ml}$ の非特異的IgGまたはAlz90抗体で24時間処理した。陽性対照として、Bu695細胞をUV照射($320\mu\text{J}/\text{cm}^2 \times 10$ 秒間)して、24時間後に試料を回収した。Alz90抗体処理したF11/APP細胞も対照に用いた。その結果を図15に示す。さらに、Bu695細胞を非特異的IgG($1\mu\text{g/ml}$)、Alz90抗体($1\mu\text{g/ml}$)、または精製 $\alpha 1680$ 抗体($0.5\mu\text{g/ml}$)で24時間処理し、試料をTUNEL染色した。対照として、UV照射($320\mu\text{J}/\text{cm}^2 \times 10$ 秒間)したBu695細胞のTUNEL染色も行った。それらの結果を図16に示す。

図15および16に示したように、UV照射したBu695細胞では、オリゴヌクレオソームの大きさに対応するDNAラダーが観察され、TUNEL陽性の細胞が著しく増加したが、Alz90抗体で処理したBu695細胞では、DNAラダーは観察されず、TUNEL陽性の核もほとんど観察されなかった。これは $\alpha 1680$ 抗体を用いた場合でも同様であり、Bu695細胞の細胞死を引き起こすことはできなかった（Ac-DEVD-CHO非存在下または存在下での $\alpha 1680$ 抗体によるBu695細胞の細胞死は、非特異的IgGによる細胞死と比較して、それぞれ $119 \pm 4\%$ または $104 \pm 2\%$ であった）。 $\alpha 1680$ 抗体処理したBu695細胞は、実質上、TUNELアッセイでDNA断片化は検出されなかった（図16）。

これらのデータは、Bu695細胞は、DNaseを含むアポトーシスを実行する機構は備えているにもかかわらず、抗APP抗体によって細胞死が起こらないことを示しており、APPにより触発されるアポトーシスを仲介する細胞内プログラムは、神経由来の細胞では作働するが、グリア由来の細胞では作働しないと考えられる。

【実施例10】 初代培養神経細胞における細胞死誘導

F11/APP細胞で観察された細胞死が、実際、脳神経においても起こりうるかを調

べるため、マウス皮質神経初代培養を用いた実験を行った。

皮質神経の初代培養は、文献 (Y.Z. Eksioglu et al., Brain Res., 644, 282, 1994) に従い調製した。調製された神経細胞は、 $2\mu\text{g/ml}$ の非特異的 IgG または Alz90 抗体で 72 時間インキュベートした。その後、細胞を Hoechst 33258 (最終濃度 $5\mu\text{M}$) で 1 分染色した (図 17)。また、キット (Boehringer Mannheim) を用いて、添付の説明書に従い TUNEL 染色を行った (図 18)。

皮質神経細胞の初代培養に、Alz90 抗体を添加したところ、Alz90 抗体により、初代培養神経細胞においてアポトーシスに特異的な核の形態変化を伴う細胞死が誘導されることが判明した。この細胞死は、対照として用いた非特異的 IgG では誘導されなかった (図 17)。また、Alz90 によるこの細胞死においては、DNA 断片化の促進が観察された (図 17)。

この細胞死に対するカスパーゼの効果を検証したところ、この細胞死は、細胞透過性カスパーゼ阻害剤である Ac-DEVD-CHO により有意に阻害され、C 末端にアルデヒド修飾を持たない細胞非透過性の Ac-DEVD (DEVD-AMC; Peptide Inc., カスパーゼ *in vitro* 基質アッセイ用) では阻害されなかった (図 18)。これらの結果は、神経の APP が、アポトーシス誘導経路で機能していることを示している。

F11/APP 細胞と同様に、初代培養神経細胞においても APP により細胞死が誘導されることから、生体内の神経細胞死のモデルとしての F11/APP 細胞の有用性が確かめられた。また、外来 APP を有さない細胞においても、APP の活性化による細胞死が誘導され得ることから、APP の活性化による細胞死が、生体内で実際に起こり得ることが示唆される。

本発明により、抗 APP 抗体により誘導される細胞死は、神経細胞に備わっているアポトーシス誘導性プログラムを介していることが示された。同様の現象が免疫細胞においても知られており、細胞表面の Fas/CD95 が、その特異的な抗体に応答して細胞死を誘導する (S. Nagata, 1997, Cell 88: 355)。この系においては 3 つの主要な特徴を持っている。1 つは、抗体が誘導する細胞死はアポトーシスであ

ること。2つ目は、抗体は、細胞表面の膜貫通タンパク質に作用すること。3つ目は抗体により誘導される細胞死は組織特異的であることである。本発明の抗体/APP系は、これら3つの特徴を全て備えており、細胞表面のFas/CD95が免疫細胞で果たしているのと同様の機能を、神経細胞において膜貫通型APPが果たしていると考えられる。APP₆₉₅とFas/CD95の細胞質領域には、相同な領域は存在しないことから、両者は、アポトーシス誘導経路を始動させるために異なる細胞内機構を使っている可能性がある。実際、APPのFAD変異体によるアポトーシスは、ヘテロ3量体Gタンパク質のG_{βγ}を介していることが報告されているが、Fas/CD95の場合は異なっている (U. Giambarella et al., 1997, EMBO J. 16: 4897)。障害や炎症がなければ、CNSにおいてFas/CD95の発現は見られない (T. Matsuyama et al., 1994, Brain Res. 657: 342; T. Matsuyama et al., 1995, Brain Res. Mol. Brain. Res. 34: 166; G.I. Botchkina et al., 1997, Mol. Med. 3: 765) ことから、膜貫通型APPは、通常、CNSの発生段階におけるプログラム細胞死等の、障害や炎症以外で見られる神経系のアポトーシスにおいて細胞死の機能を果たしていると予想される。

[実施例 11] 家族性AD型変異APP(FAD-APP)の発現誘導系の構築

本発明者らは以前、家族性アルツハイマー病(FAD)に見られるAPP₆₉₅の3種のV642変異体(FAD-APPs)をF11細胞で一過的に発現させると、DNAの断片化が起こることをTUNEL染色により示した(T. Yamatsujiら, 1996, Science 272:1349-1352)。しかしながら、トランスフェクションによる一過的発現による実験では、遺伝子が導入される細胞の割合が低く、また、発現のタイミングが揃わないなどの問題のため、細胞死がアポトーシスであるか否かを含め、細胞死の詳しい解析は困難であり、また、細胞死阻害剤のスクリーニング等に用いることは困難であった。

そこで、活性型の変異APPの発現を外的刺激により誘導できるFAD-APPの発現誘導系の構築を試みた。この系では、エクダイソンに応答してFAD-APP (V642I APP)の発現が誘導されるF11細胞系(F11/EDXR/V642I)の構築を行った(図19)。まず、

エクダイソン受容体とRXRの両者を発現するベクター (pVgRXR; Ecdysone-inducible Mammalian Expression Kit, Invitrogen社) をF11細胞にトランスフェクションし、Zeocinにより選択することによりエクダイソン受容体およびRXRを発現するF11細胞 (F11/EDXR) を得た。次にエクダイソン受容体応答配列を含むpINDベクター (Invitrogen社) に全長V642I APP cDNA (T. Yamatsuji et al., 1996, Science 272: 1349-1352) を組み込み、F11/EDXR細胞にトランスフェクションし、G418選択を行った。得られた細胞を限界希釈することにより、F11/EDXR/V642Iをクローニングした。

細胞は、10% FBSを含むHamF-12培地で24時間培養した後、エクダイソン (20 μ M Muristerone) を含む10% FBS含有 HamF-12 培地で細胞をインキュベートした。その結果、2~3日のインキュベーションにより、全細胞の80~90%で細胞死を誘導することに成功した (図20)。エクダイソンを添加しなかった対照では、ほとんど細胞死は起こらなかった。また、エクダイソンの添加により引き起こされる細胞死は、Ac-DEVD-CHOにより抑制された。細胞死に伴い、典型的な核の切断 (cleavage)、cellular blebbing、細胞質の凝縮 (shrinkage) が見られ、最終的にはディッシュからはがれた (図21および22)。エクダイソンとして、20 μ M Muristerone の代わりに 40 μ M Ponasterone を用いても、同様の結果を得た。

以上のように、家族性アルツハイマー病変異あるいは活性型変異APPの発現誘導系が構築された。これにより、家族性AD型変異APPの機能解析や、FAD-APPによる細胞死の阻害剤のスクリーニングを行うことが可能となった。また、上記のデータから、APPのV642I変異体はアポトーシスを誘導することが実証され、FADに見られる変異が、APPが関与するアポトーシス誘導機能を活性化していることが示された。

産業上の利用の可能性

本発明によって、APPアゴニストによって、非常に高い効率で神経細胞の細胞死

が誘導されることがわかった。本発明の細胞系を用いて、APPリガンドなどのAPPの活性化による細胞死の誘導剤をスクリーニングすることが可能となった。さらに、活性型変異APPの発現誘導系が提供された。また、これらの系を用いて、APPアンタゴニストなどの、APPの活性化による細胞死の抑制剤をスクリーニングすることが可能となった。スクリーニングにより得られる、細胞死を抑制する薬剤は、アルツハイマー病を含む、神経細胞死が関与する疾患の治療のための薬剤としての利用が期待される。

請求の範囲

1. 外来性のAPPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞。
2. APPがAPP₆₉₅である、請求項1に記載の神経細胞。
3. F11細胞である、請求項1または2に記載の神経細胞。
4. 外来性APPの発現によって細胞内全体のAPP発現量が、内因性APPの発現量の約20倍となっている、請求項3に記載の神経細胞。
5. 活性型変異APPを誘導的に発現させることができ、該活性型変異APPの発現により細胞死が誘導されうる神経細胞。
6. 核内受容体をコードするDNAを含むベクターおよび該核内受容体の応答配列の下流に機能的に結合した活性型変異APPをコードするDNAを含むベクターを含み、該核内受容体に対するリガンドの接触により該活性型変異APPの発現が誘導されうる、請求項5に記載の神経細胞。
7. 核内受容体がエクダイソン受容体であり、エクダイソン処理により活性型変異APPの発現が誘導される、請求項6に記載の神経細胞。
8. F11細胞である、請求項5から7のいずれかに記載の神経細胞。
9. APPの活性化による神経細胞の細胞死を誘導する方法であって、APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞に対し、APPの活性化を誘導する化合物を接触させる工程を含む方法。
10. APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞が、請求項1から4のいずれかに記載の神経細胞である、請求項9に記載の方法。
11. APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞が、脳の皮質神経の初代培養細胞である、請求項9に記載の方法。
12. APPの活性化を誘導する化合物がAPPに結合する抗体である、請求項9から11のいずれかに記載の方法。
13. 抗体がAPPの細胞外領域に結合する抗体である、請求項12に記載の方法。

14. APPの活性化による神経細胞の細胞死を誘導する方法であって、請求項5から8のいずれかに記載の神経細胞に対し、活性型変異APPを誘導的に発現させることのできる化合物を接触させる工程を含む方法。

15. APPの活性化による神経細胞の細胞死を誘導する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞に対し、被検試料を接触させる工程、

(b) 該神経細胞の細胞死を検出する工程、および

(c) 該神経細胞の細胞死を誘導する化合物を選択する工程、を含む方法。

16. APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞が、請求項1から4のいずれかに記載の神経細胞である、請求項15に記載の方法。

17. APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞が、脳の皮質神経の初代培養細胞である、請求項15に記載の方法。

18. APPの活性化による神経細胞の細胞死の誘導を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞に対し、APPの活性化を誘導する化合物および被検試料を接触させる工程、

(b) 該神経細胞の細胞死を検出する工程、並びに

(c) 該神経細胞の細胞死の誘導を抑制する化合物を選択する工程、を含む方法。

19. APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞が、請求項1から4のいずれかに記載の神経細胞である、請求項18に記載の方法。

20. APPを発現し、APPの活性化により細胞死が誘導されうる神経細胞が、脳の皮質神経の初代培養細胞である、請求項18に記載の方法。

21. APPの活性化を誘導する化合物がAPPに結合する抗体である、請求項18から20のいずれかに記載の方法。

22. 抗体がAPPの細胞外領域に結合する抗体である、請求項21に記載の方法。

23. APPの活性化による神経細胞の細胞死の誘導を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項5から8のいずれかに記載の神経細胞に対し、活性型変異APPを誘導的に発現させることができる化合物および被検試料を接触させる工程、

(b) 該神経細胞の細胞死を検出する工程、並びに

(c) 該神経細胞の細胞死の誘導を抑制または促進する化合物を選択する工程、を含む方法。

24. 神経細胞の細胞死を誘導する化合物または該誘導を阻害若しくは促進する化合物のスクリーニングのためのキットであって、請求項1から8のいずれかに記載の神経細胞を含むキット。

25. APPの活性化による神経細胞の細胞死を誘導する化合物を有効成分とする、神経細胞の細胞死誘導剤。

26. APPの活性化による神経細胞の細胞死を誘導する化合物がAPPアゴニストである、請求項25に記載の細胞死誘導剤。

27. APPアゴニストがAPPに結合する抗体である、請求項26に記載の細胞死誘導剤。

28. APPに結合する抗体がAPPの細胞外領域に結合する抗体である、請求項27に記載の細胞死誘導剤。

29. APPの活性化による神経細胞の細胞死の誘導を阻害する化合物を有効成分とする、神経細胞における細胞死の阻害剤。

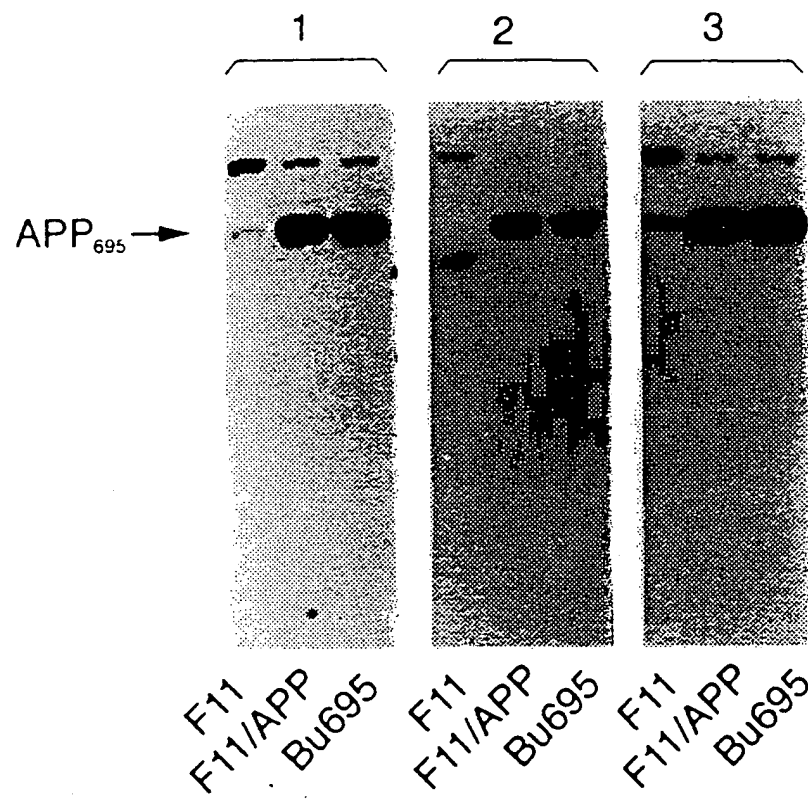
30. APPの活性化による神経細胞の細胞死の誘導を阻害する化合物がAPPアンタゴニストである、請求項29に記載の細胞死の阻害剤。

31. 神経細胞の細胞死に起因する疾病を予防または治療する薬剤である、請求項29または30に記載の阻害剤。

32. 神経細胞の細胞死に起因する疾病がアルツハイマー病である、請求項31に記載の阻害剤。

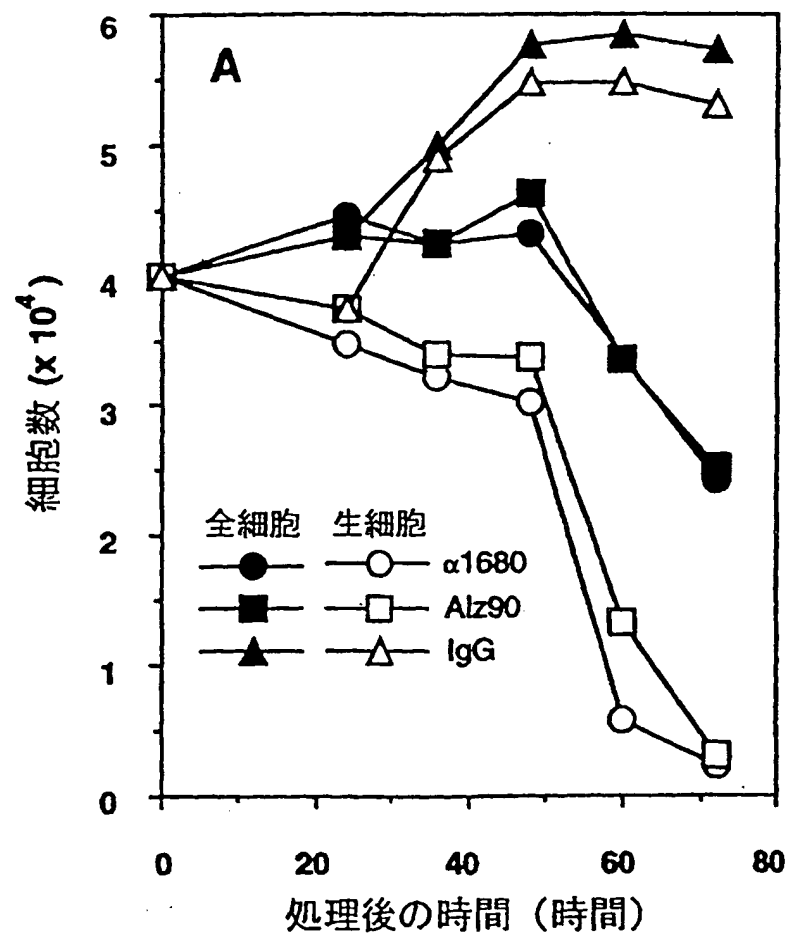
1 / 2 2

☒ 1



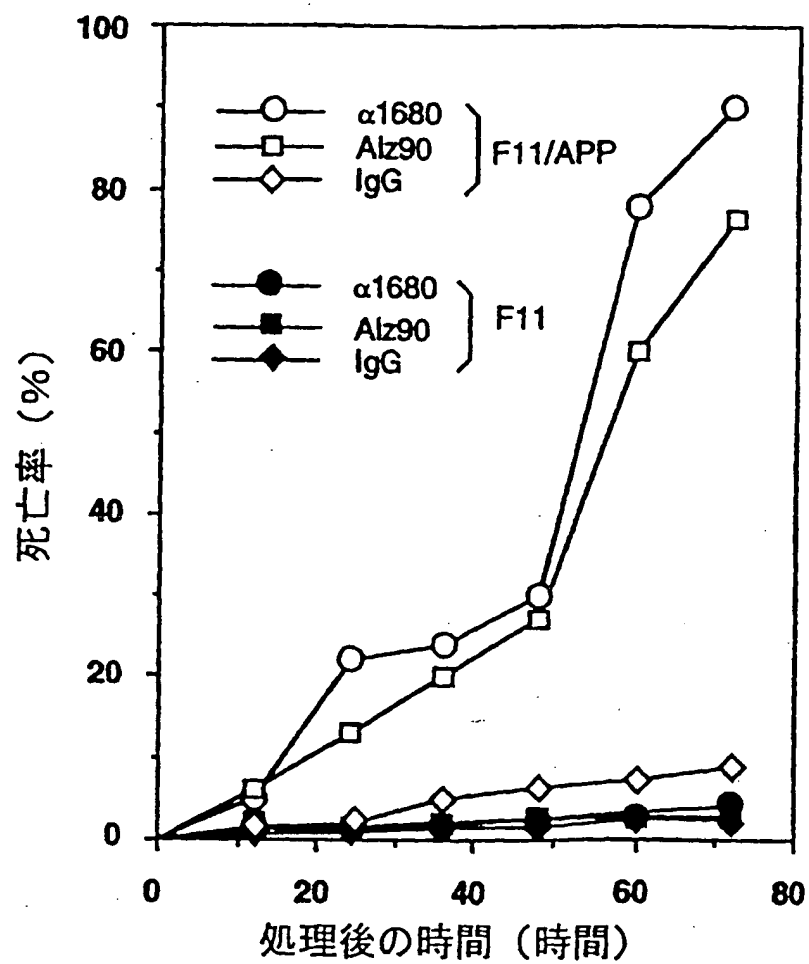
2 / 2 2

図 2



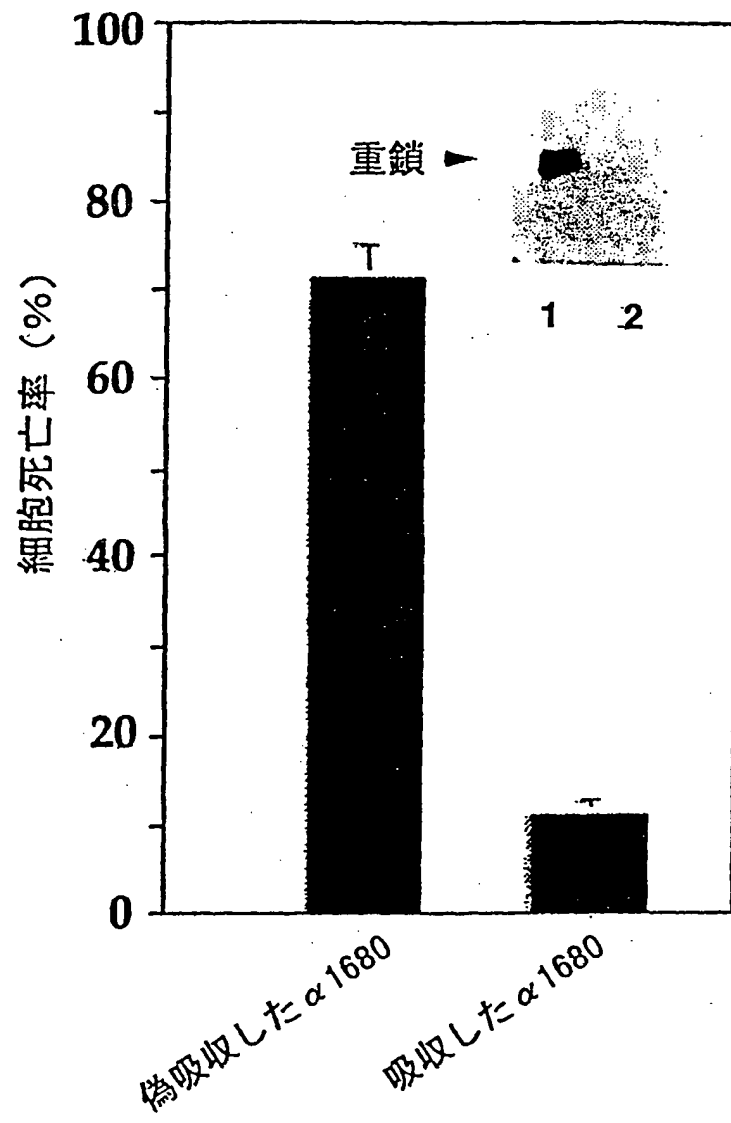
3 / 2 2

図 3



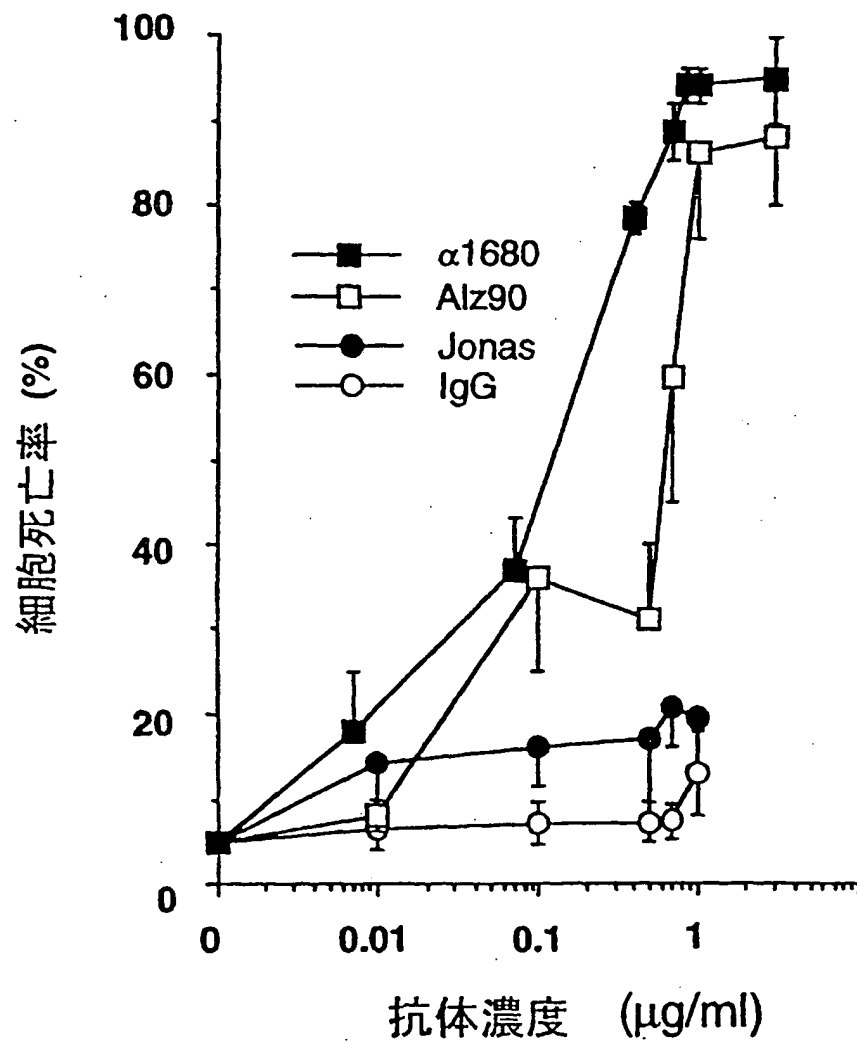
4/22

図 4



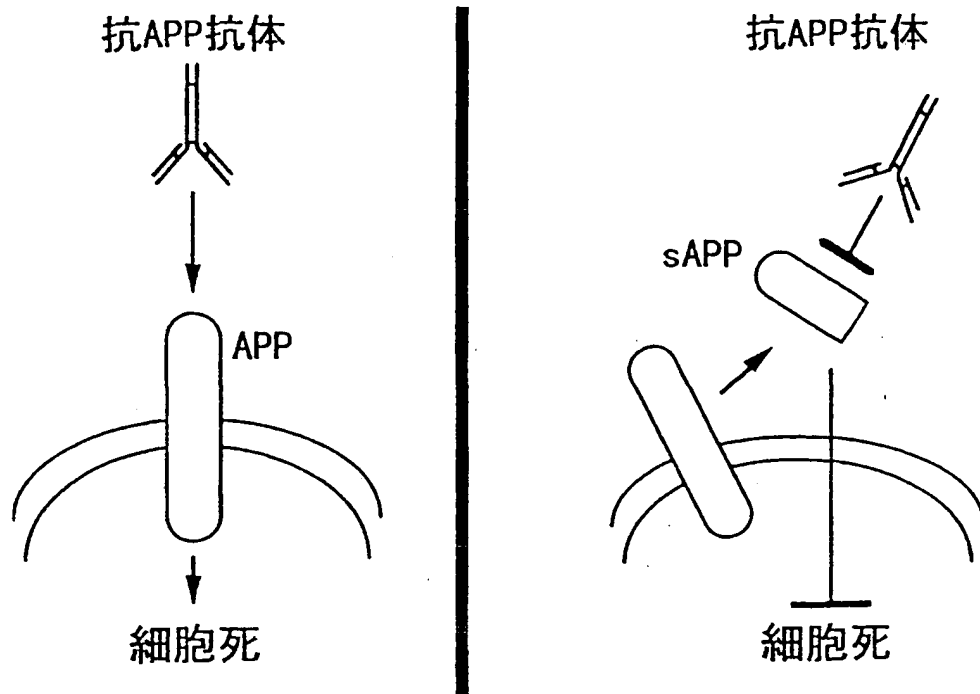
5 / 22

図 5



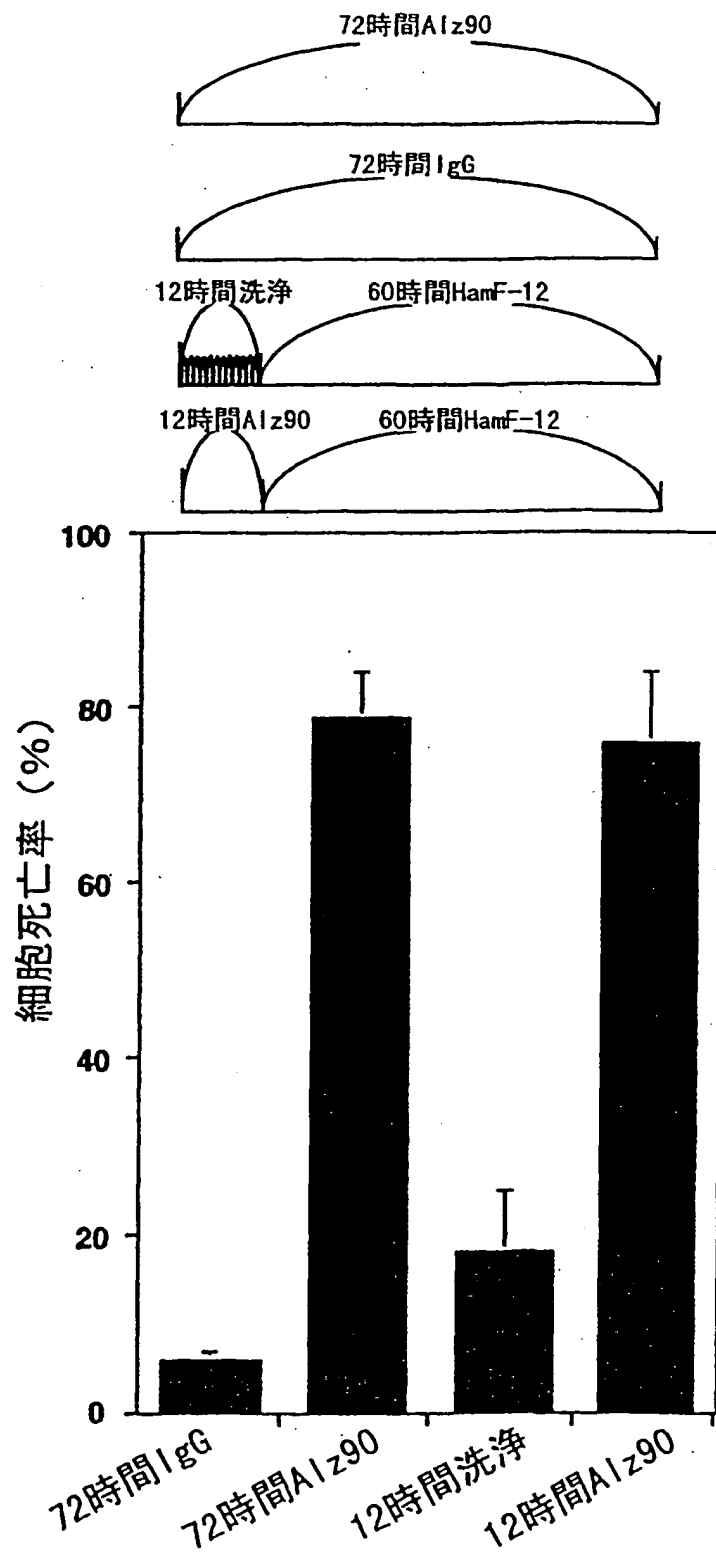
6 / 2 2

図 6



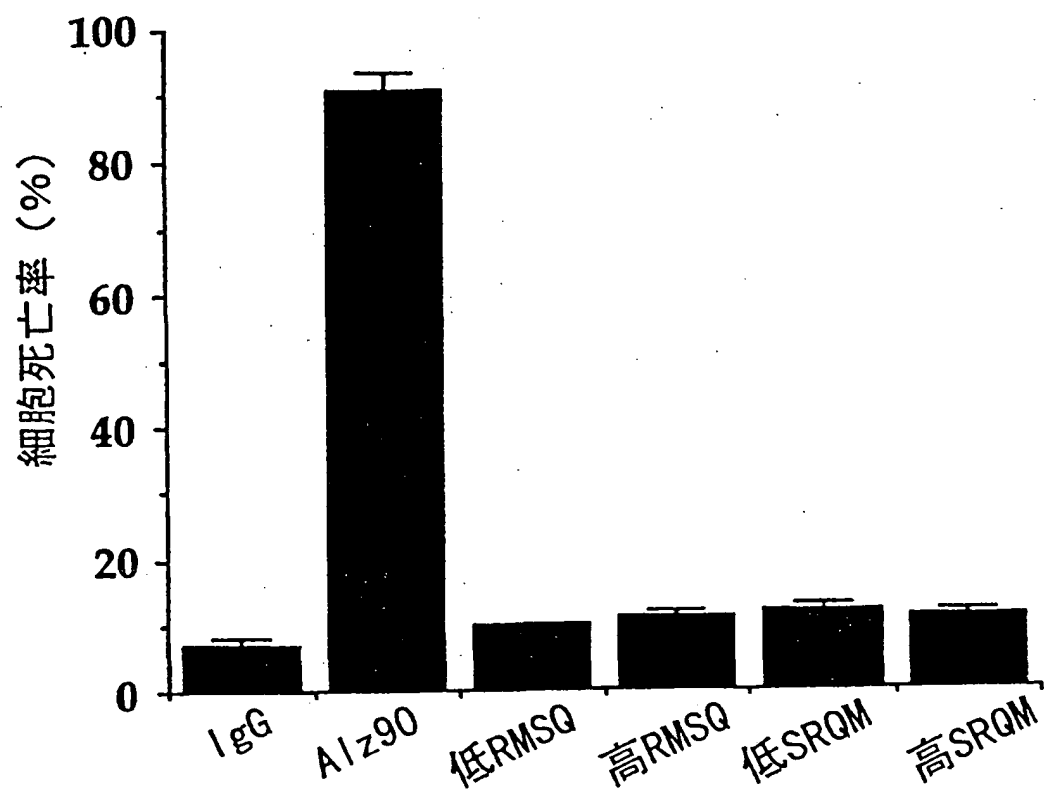
7 / 2 2

図 7



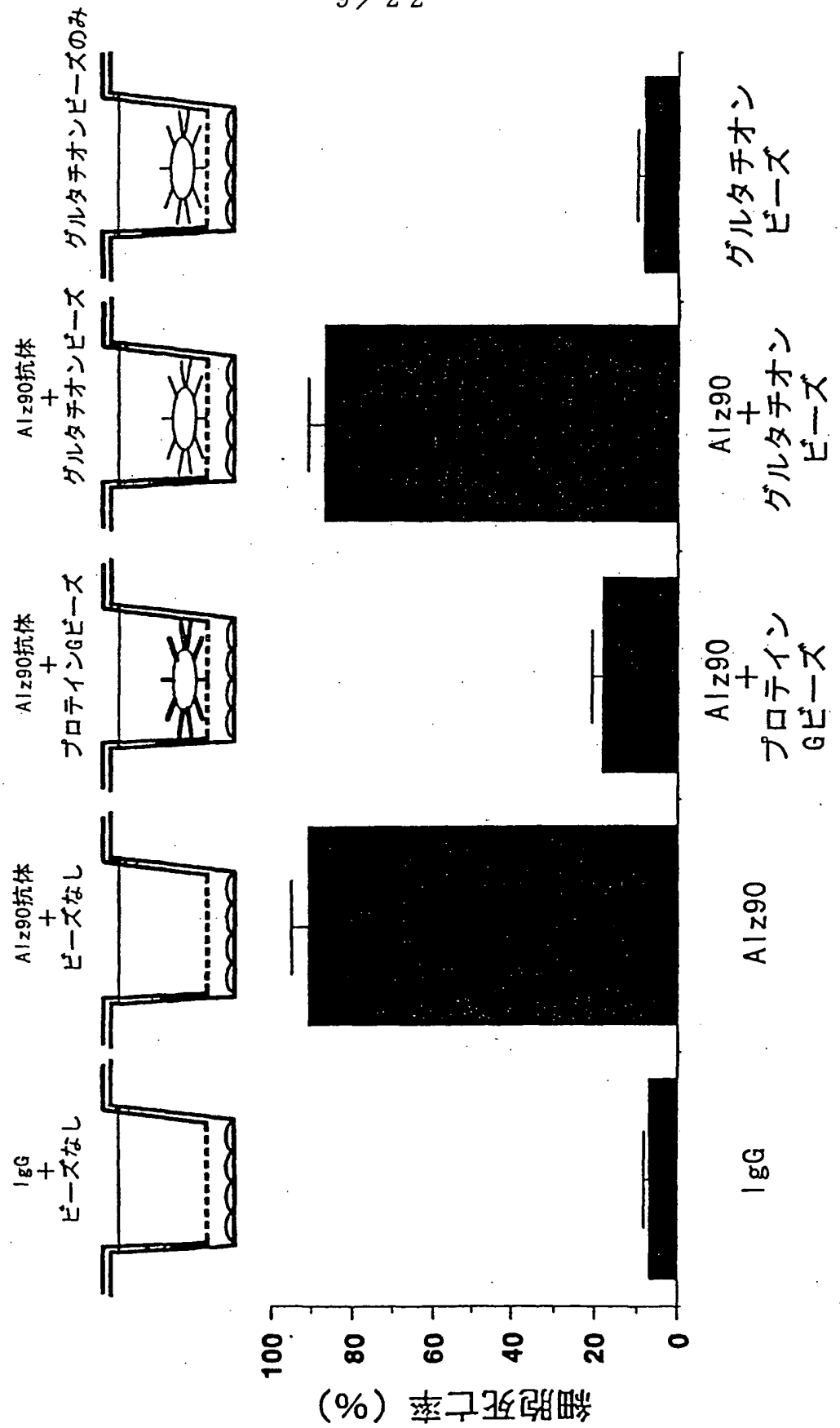
8/22

図 8



9 / 2 2

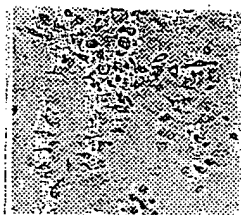
図 9



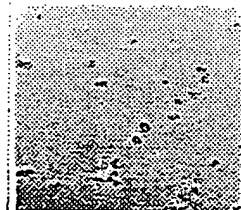
10/22

図 10

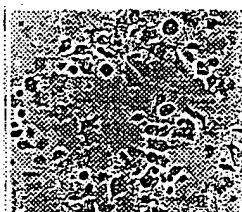
IgG



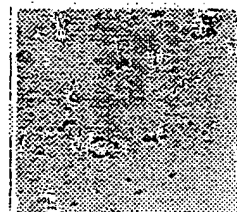
Alz90



Alz90+プロテインGビーズ

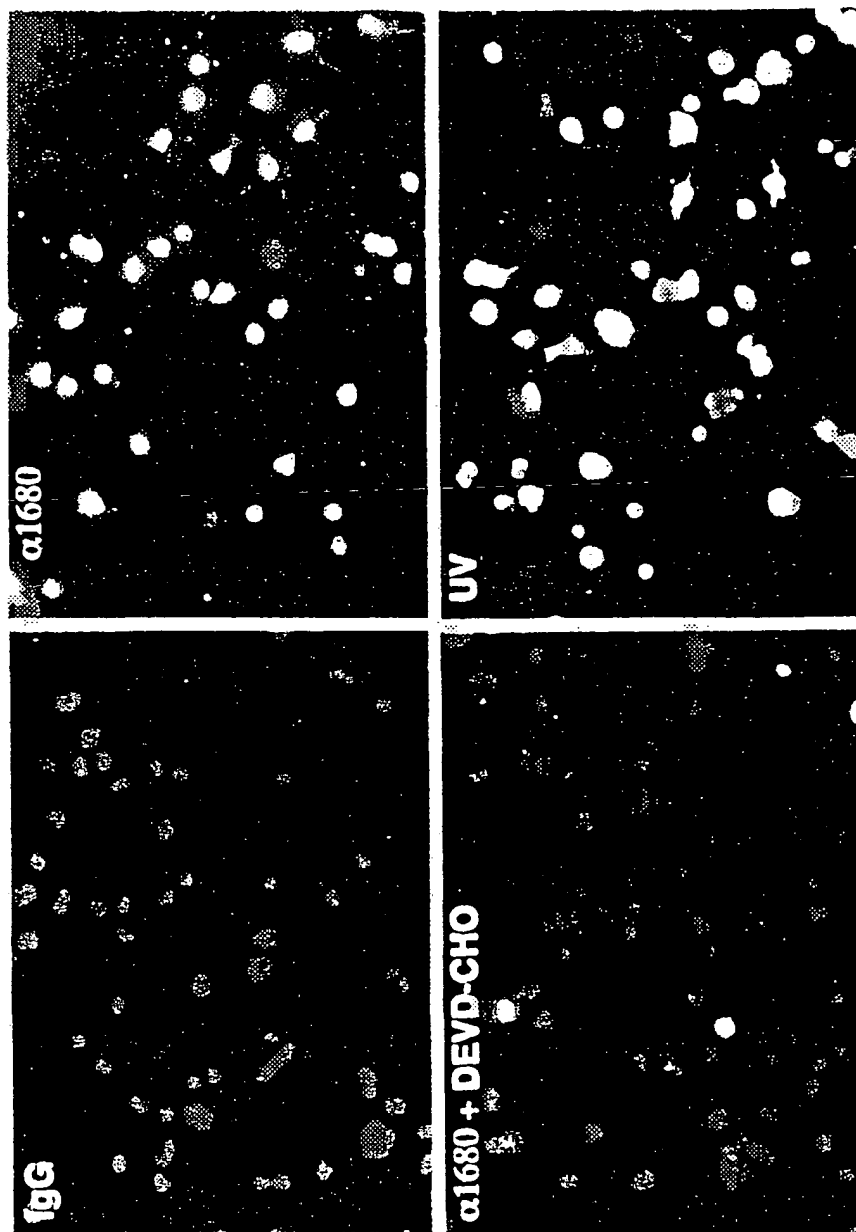


Alz90+グルタチオンビーズ



11 / 22

☒ 11

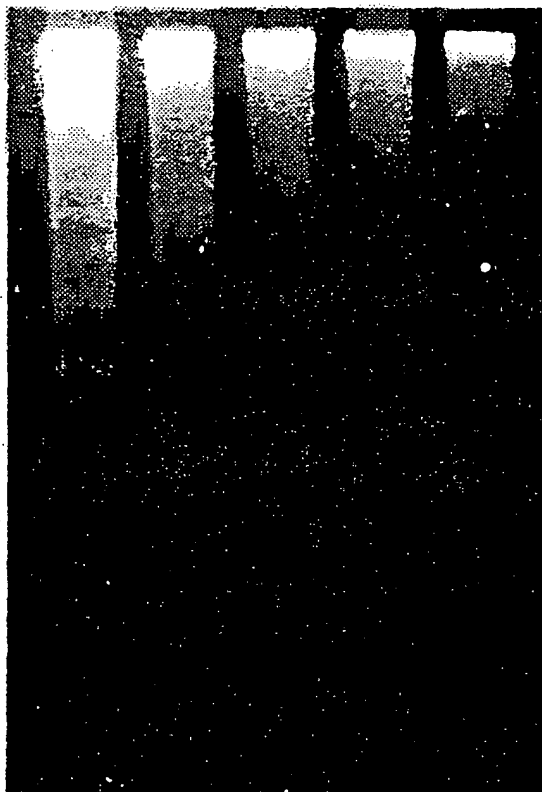


12/22

☒ 12

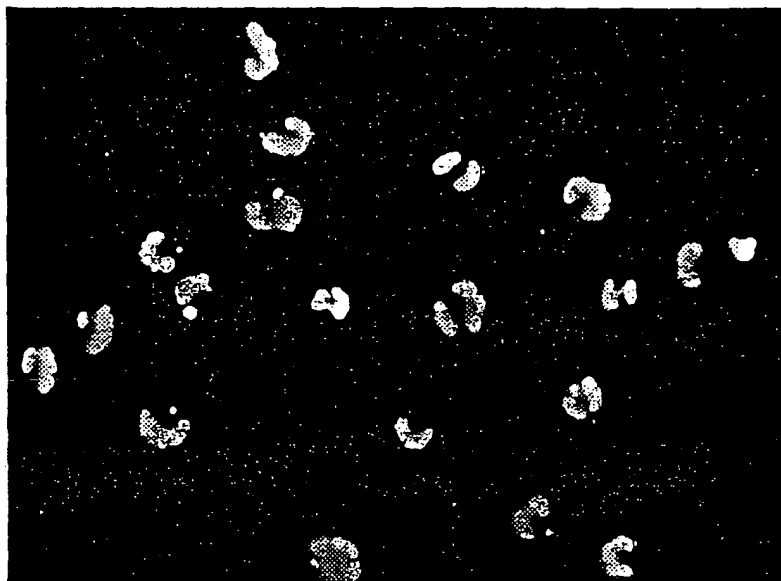
Ac-DEVD-CHO

(-)



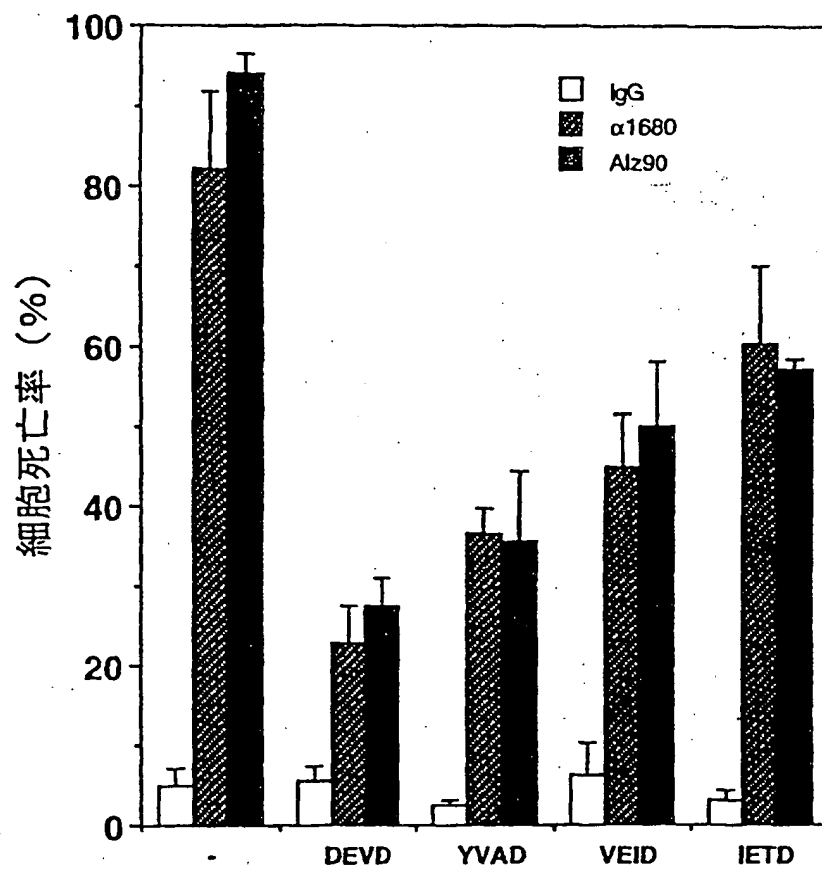
13/22

図 13



14/22

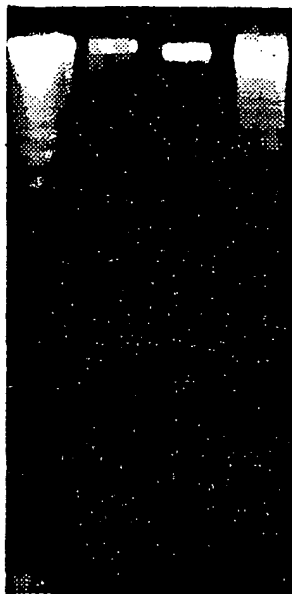
図 14



15/22

図 15

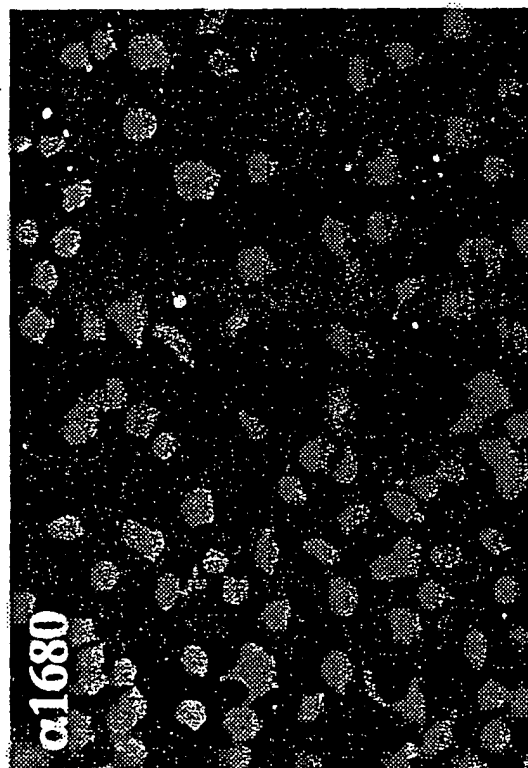
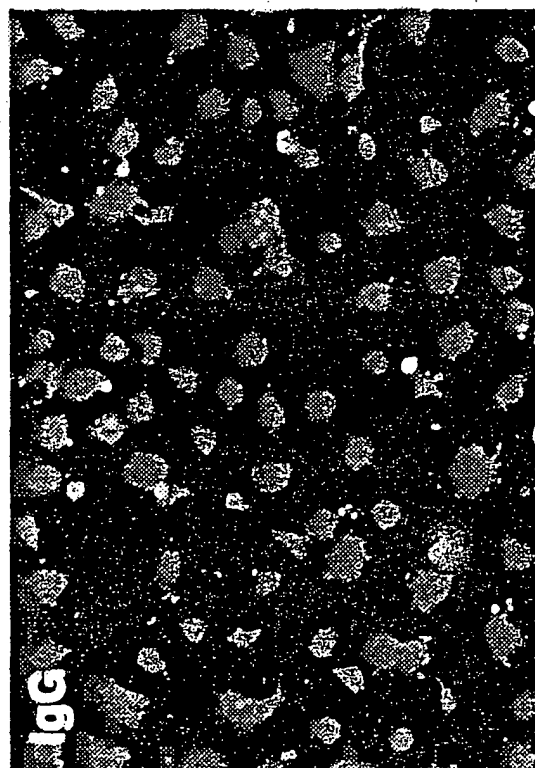
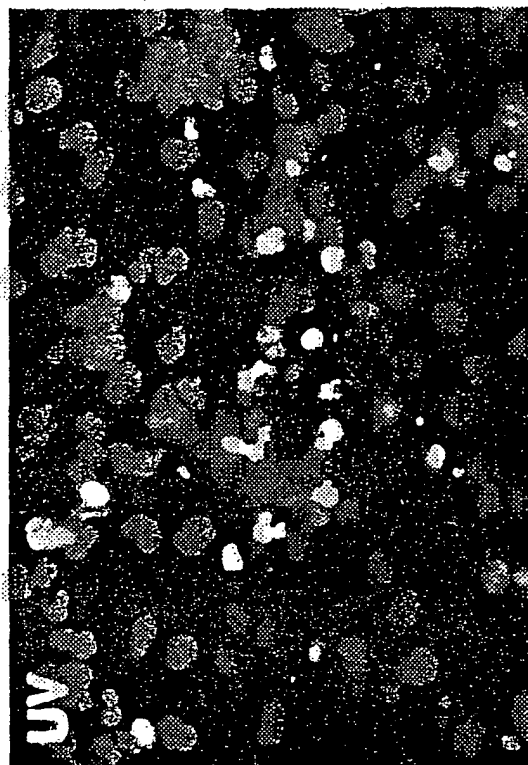
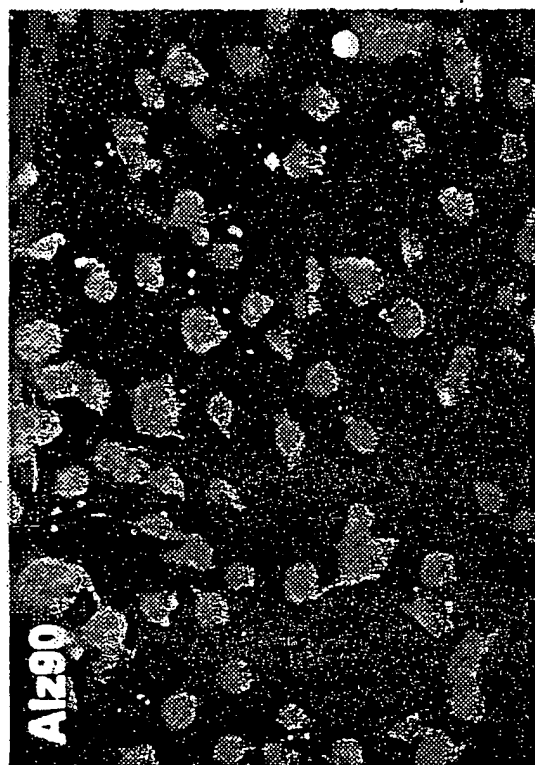
Bu695 F11/APP



UV IgG 抗APP

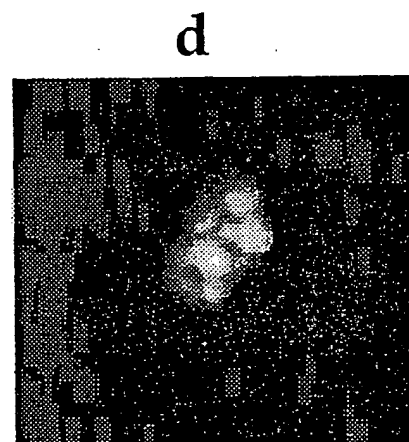
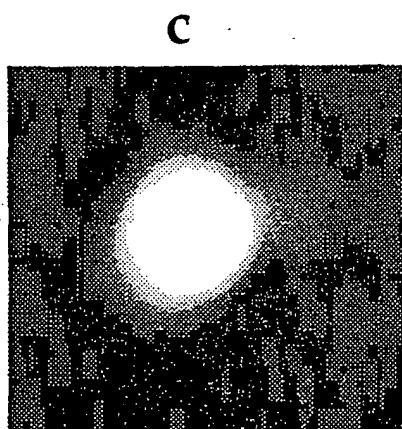
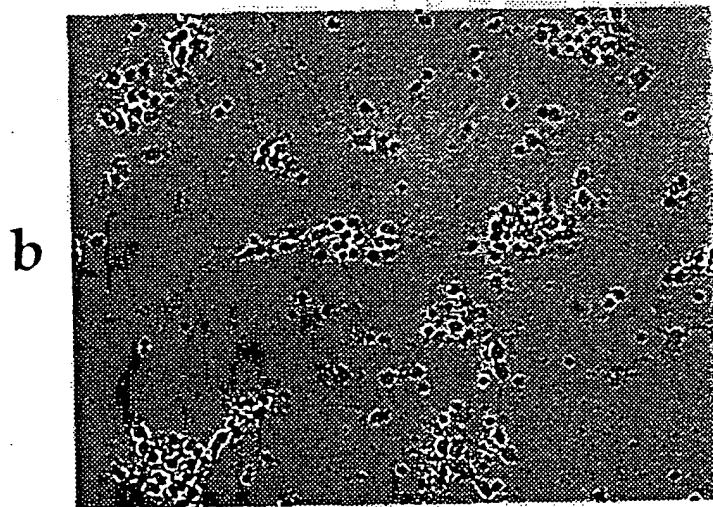
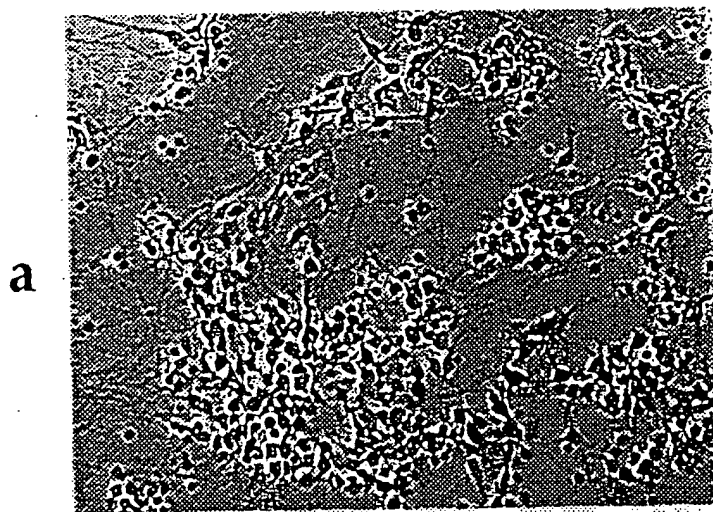
16/22

16



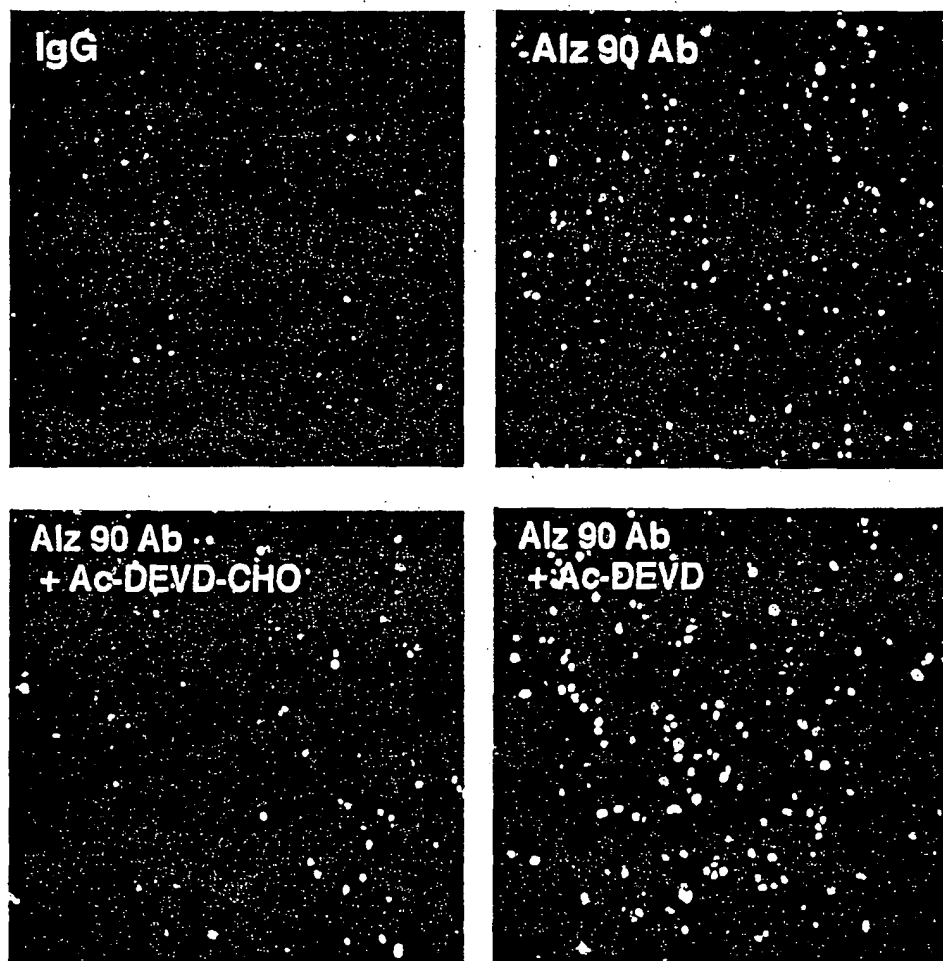
17/22

図 17



18/22

18



19/22

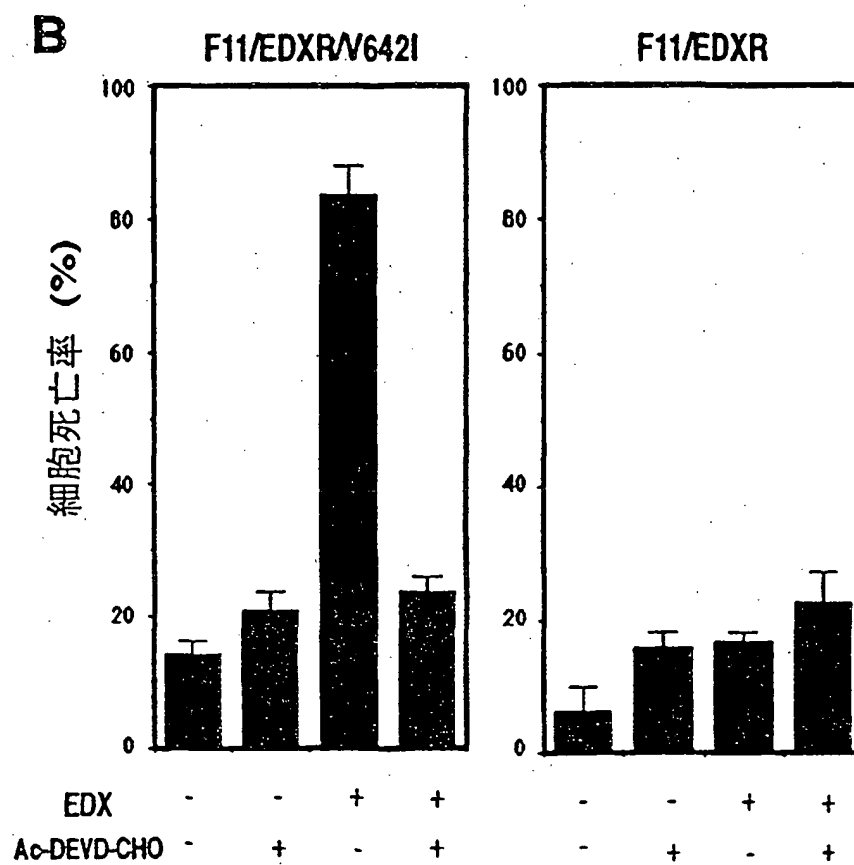
19



EDX - +

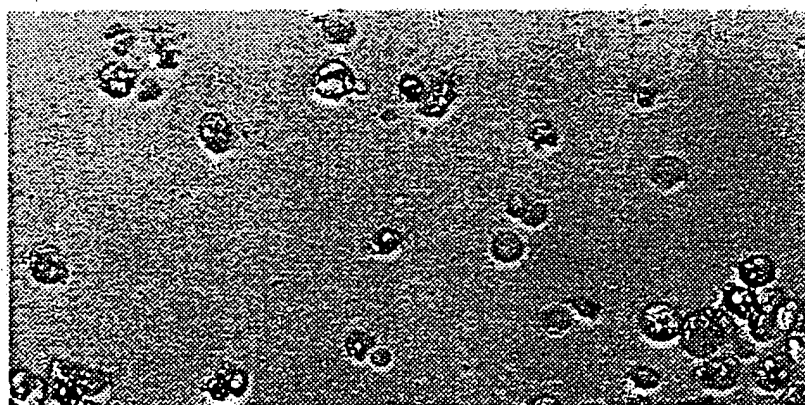
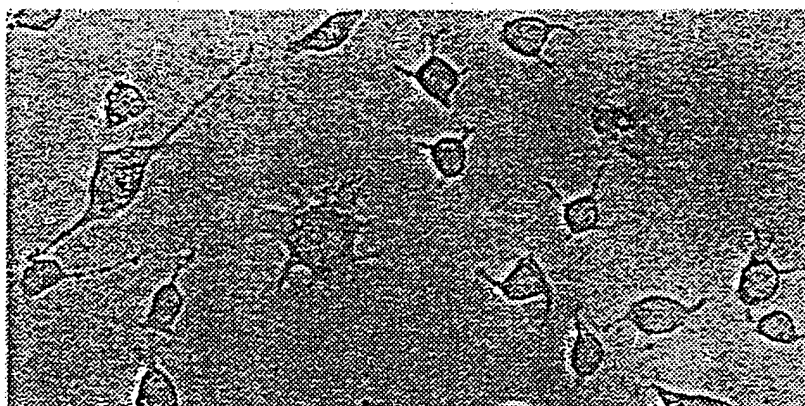
20/22

図 20



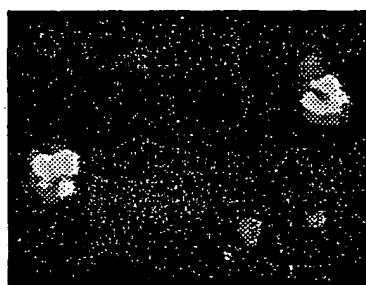
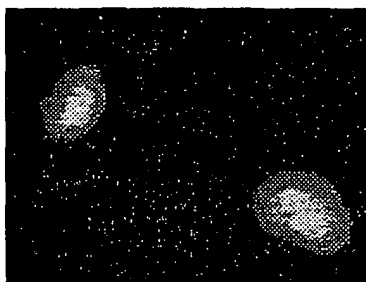
21 / 22

図 21



22/22

22



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04771

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N5/10, C12N15/12, A61K39/395, G01N33/50, C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N5/10, C12N15/12, A61K39/395, G01N33/50, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Isao Nishimura et al. "Degeneration In Vivo of Rat Hippocampal Neurons by Wild-Type Alzheimer Amyloid Precursor Protein Overexpressed by Adenovirus-Mediated Gene Transfer", The Journal of Neuroscience (1998), Vol.18, No.7, pages 2387-2398	1-32
A	I. Nisimoto et al. "A New Paradigm for Neurotoxicity by FAD Mutants of β APP: A Signaling Abnormality" Neurobiology Of Aging (1998) Vol.19 No.1S P.S33-S38	1-32

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 December, 1999 (10.12.99)Date of mailing of the international search report
21 December, 1999 (21.12.99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁶ C12N5/10, C12N15/12, A61K39/395, G01N33/50, C12Q1/02		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁶ C12N5/10, C12N15/12, A61K39/395, G01N33/50, C12Q1/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Isao Nishimura et al. "Degeneration <i>In Vivo</i> of Rat Hippocampal Neurons by Wild-Type Alzheimer Amyloid Precursor Protein Overexpressed by Adenovirus-Mediated Gene Transfer" The Journal of Neuroscience (1998) Vol.18 No.7 P.2387-2398	1-32
A	I.Nisimoto et al. "A New Paradigm for Neurotoxicity by FAD Mutanys of β APP: A Signaling Abnormality" Newrobiology of Aging (1998) Vol.19 No.1S P.S33-S38	1-32
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 10.12.99	国際調査報告の発送日 21.12.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9358

DESCRIPTION

NEURONAL CELL DEATH RECEPTOR

5 Technical Field

The present invention belongs to the field of "neurophysiology," specifically relates to neuronal cell death.

Background Art

10 Alzheimer's disease (AD) is one of neurodegenerative diseases on which histopathological research task is now most energetically pushed forward. The disease is generally characterized by progressive loss of neuronal cells, intraneuronal tangles, and extracellular senile plaques. The major constituent of the senile plaques is amyloid
15 β protein ($A\beta$). $A\beta$ is produced by being cleaved off from a transmembrane precursor called APP. Since APP₆₉₅ having 695 amino acid residues was identified in 1987 (J. Kang et al., 1987, Nature, 325: 733), at least 10 types of APP isoforms are known to be produced from a single gene by alternative splicing (R. Sandbrink et al., 1994,
20 J. Biol. Chem., 269: 1510). An APP₆₉₅ which lacks protease-inhibiting region is expressed chiefly in the brain (R.L. Neve et al., 1988, Neuron, 1: 669; P. Ponte et al., 1991, Mol. Brain Res., 9: 259). An APP-deficient mouse has maldevelopment in the central nervous system (CNS) (U. Muller et al., 1994, Cell, 79: 755; H. Zheng et al., 1995,
25 Cell, 81: 525). This finding suggests that APP has a physiological function in addition to the pathological function as the precursor of $A\beta$. According to a recent study using doubly-targeted mouse that is deficient in both APP and APLP2, which is an APP-like molecule exhibiting high homology to APP (C.S. von Koch et al., 1997, Neurobiol.
30 Aging, 18: 661), APP is suggested to function in embryogenesis and in early neuronal development.

However, so far, there are only limited findings on the original function of APP. APP has been believed to participate in the proliferation of neuronal cells and axonal outgrowth (D. Schubert
35 et al., 1989, Biochem. Biophys. Res. Commun. 162: 83; E.A. Milward et al., Neuron, 1992, 9: 129; M. P. Mattson et al., 1993, Trends Neurosci.

16: 409; D.H. Small et al., 1994, J. Neurosci. 14: 2117). However, these functions are associated with the soluble APP. What is known about membrane-bound APP is only the fact that membrane-bound APP is abundantly localized in the synapse. This suggests that transmembrane APP is involved in physiological function in the neuron (W. Schubert et al., 1991, Brain Res. 563: 184). The overexpression of APP in fibroblast cells inhibits their cellular adhesion. Therefore, APP is also recognized to function on cell surface (K. Ueda et al., 1989, Annals Neurol. 25: 246). Recently, APP has been believed to function as a cell surface receptor in neurons (A. Ferreira et al., 1993, J. Neurosci. 13: 3112; J.G. Culvenor et al., 1995, Exp. Cell. Res. 220: 474), based on recent analytical studies particularly on cell surface expression of APP in neurons (S.S. Jung et al., 1996, J. Neurosci. Res. 46: 336), specific interaction between APP and trimeric G protein Go (Nishimoto et al., 1993, Nature, 362: 75-79; Brouillet et al., 1999, J. Neurosci, 19: 1717-1727), interaction with Fe65, which is an intracellular Shc-like signal transduction factor (F. Fiore et al., 1995, J. Biol. Chem. 270: 30853), and others. *In vitro* experiments have also revealed that transmembrane APP₆₉₅ has a function associated with signal transduction, that this function is regulated upon ligand binding (T. Okamoto et al., 1995, J. Biol. Chem. 270: 4205), and that the function associated with signal transduction is activated with each of three types of APP₆₉₅ mutants found in patients with familial Alzheimer's disease (FAD) (T. Okamoto et al., 1996, EMBO J. 15: 3769). It has also been reported that overexpression of wild-type APP by using a virus vector results in degeneration in primary cultured neurons (I. Nishimura et al., 1998, J. Neurosci. 18: 2387).

It has been known that the transient introduction of APP gene carrying a familial AD-type mutation (FAD-APP) into F11 cells induces apoptosis of the cells (T. Yamatsuji et al., 1996, Science 272: 1349-1352). However, the gene was expressed and induced the death in only a small number of cells in this system, and the frequency of induced cell death strongly depending on the efficiency of gene introduction. Because of these, the previous system is unsuitable for the screening of anti-Alzheimer's disease eradicated drug that

antagonizes neuronal loss. The difficulty can be overcome by establishing a neuronal cell line that stably expresses FAD-APP, however, such attempts were entirely unsuccessful until now. It has also been unknown whether or not transmembrane APP₆₉₅ functions as a receptor for neuronal cell death.

Disclosure of the Invention

An objective of the present invention is to provide a method for inducing neuronal cell death associated with APP activation. Another objective of the present invention is to provide an inducing agent for neuronal cell death associated with APP activation, an inhibitor or enhancer for the induction, a method for the screening of the inhibitor or enhancer, and a kit for the screening.

The present inventors deduced that the APP mutant was an active molecule that gave the constitutive signal; that, hence, the difficulty in the establishment of neuronal cell line that stably expresses FAD-APP could result from cell death of FAD-APP-expressing neuronal cell; and that, thus, the establishment of the cell line failed. Then, they considered that, on the contrary, threshold value of the intracellular signal input level for cell death, which depended on the expression level of normal APP, would be high enough to afford the cell line stably expressing APP. If it is possible to develop a system where cell death is inducible with nearly 100% efficiency by treating neuronal cells stably expressing APP with an antibody or the like functioning as an APP agonist, such a system is ideal for the screening of the antagonistic agent and the search for APP agonist, in which system the death can be induced in nearly all the cells and the cell mortality rate is constant. The previously possible system using FAD-APP serves as a neuronal cell death model for familial Alzheimer's disease, which comprises only a small rate among cases of Alzheimer's disease. If a system using normal APP is developed, it can be assumed that such a system serves as an *in vitro* model not for familial Alzheimer's disease, comprising only the minority of the disease, but for sporadic Alzheimer's disease, that comprises by far the majority of the disease, because neuronal cell death is induced by non-mutant APP in the system. The search for the antagonistic agent, which is conducted based on

this system, will greatly contribute to the development of agent for treating general Alzheimer's disease.

Then the present inventors constructed a vector for the expression of APP₆₉₅, which is a neuronal isoform of APP and lacks the protease-inhibiting region but retains the remaining APP regions including the extracellular region and intracellular region. The vector was introduced into a neuronal cell line F11 to provide F11 neuronal cells stably expressing APP₆₉₅ (F11/APP cell). The cell was found to overexpress APP₆₉₅ at about 20 times higher level relative to the parental F11 cell line. When the cells were treated with an anti-APP monoclonal antibody that recognized the extracellular domain of APP, it was found that DNA fragmentation and nuclear morphology changes characteristic of apoptosis were induced in nearly all the cells within 24 hours and the death occurred in almost all the cells in 72 hours. The inventors also investigated characteristics of the cell death induced by the anti-APP monoclonal antibody and APP and found chromosomal DNA laddering and nuclear compaction characteristic of apoptosis, as well as found that the cell death was inhibited by an inhibitor for caspase that is recognized to participate in apoptotic cell death. Further the inventors clarified that the anti-APP monoclonal antibody did not induce the death of glioma cells overexpressing APP₆₉₅. The fact that the anti-APP antibody directly interacts with APP on the neuronal cell surface and the ligand-specific APP activation induces the death of neuronal cell suggests that membrane-bound APP has a biological function as a receptor associated with cell death. From these findings, the present inventors have clarified that, depending upon APP agonist, APP induces neuron-specific apoptosis, which results in the death of neuronal cell.

The inventors further developed a system capable of inducing the expression of not normal APP but FAD-APP, which is an active form mutant of APP₆₉₅ found in familial Alzheimer's disease. As described above, the previously developed cell lines expressing FAD-APP were transient expression systems, their FAD-APP expression efficiency is low and variable, and therefore the system is unsuitable for detailed analyses for cell death and screening of cell death inhibitors and

such. If it is possible to develop a cell system where the active APP mutant is hardly or not expressed without stimulation but the expression is induced in all the cells in the presence of an external stimulus, then the problems can be overcome. Hence, the inventors introduced a DNA encoding the active APP mutant into F11 cells, thereby achieving the construction of a new cell line in which the expression could be induced in response to ecdysone. The effect of ecdysone was tested by acting it on this system and, as a result, the expression of active APP mutant was induced. Thus it was demonstrated that the death could be induced in almost all the cells within a certain period of time. Like the death of F11/APP cell, the cell death event showed the characteristics of apoptosis. The fact also supports that the activation of membrane-bound APP is a cause of Alzheimer's disease.

The above-mentioned death-inducing system of neuronal cell can be used for the screening of APP antagonist and APP agonist. Compounds isolated by this screening are thought to be applied to prevention and treatment of neuronal disorders.

The present invention relates to a method for inducing neuronal cell death associated with APP activation, an inducing agent for neuronal cell death associated with APP activation, an inhibitor or enhancer for the induction, a method for the screening the inhibitor or enhancer, and a kit for the screening and more specifically relates to:

- (1) a neuronal cell expressing a foreign APP that induces the death of the cell can be induced when activated;
- (2) the neuronal cell of (1), wherein the APP is APP₆₉₅;
- (3) the neuronal cell of (1) or (2), wherein the cell is an F11 cell;
- (4) the neuronal cell of (3), wherein the total intracellular expression level of endogenous APP and the foreign APP is about 20 times as much as the expression level of the endogenous APP alone;
- (5) a neuronal cell inducibly expressing an active APP mutant that can induce the death of the cell;
- (6) the neuronal cell of (5), wherein the cell contains a vector comprising a DNA encoding a nuclear receptor and a vector comprising a DNA encoding an active APP mutant that is functionally connected

downstream of a responsive element for the nuclear receptor and wherein the expression of the active APP mutant can be induced by contact of a ligand with the nuclear receptor;

5 (7) the neuronal cell of (6), wherein the nuclear receptor is an ecdysone receptor and wherein the expression of the active APP mutant is induced by the treatment with ecdysone;

(8) the neuronal cell of any one of (5) to (7), wherein the cell is an F11 cell;

10 (9) a method for inducing neuronal cell death associated with APP activation, the method comprising contacting a compound inducing APP activation with a neuronal cell expressing an APP that induces the death of the cell when activated;

(10) the method of (9), wherein the neuronal cell is the neuronal cell of any one of (1) to (4);

15 (11) the method of (9), wherein the neuronal cell is a primary cultured cell derived from a brain cortex neuron;

(12) the method of any one of (9) to (11), wherein the compound is an antibody that binds to an APP;

20 (13) the method of (12), wherein the antibody is an antibody that binds to the extracellular region of an APP;

(14) a method for inducing neuronal cell death associated with APP activation, the method comprising contacting a compound inducing the expression of an active APP mutant with the neuronal cell of any one of (5) to (8);

25 (15) a method for screening a compound inducing neuronal cell death associated with APP activation, the method comprising:

(a) contacting a test sample with a neuronal cell expressing an APP that induces the death of the cell when activated,

(b) detecting the death of the neuronal cell, and

30 (c) selecting a compound inducing the death of the neuronal cell;

(16) the method of (15), wherein the neuronal cell is the neuronal cell of any one of (1) to (4);

(17) the method of (15), wherein the neuronal cell is a primary cultured cell derived from brain cortex neuron;

35 (18) a method for screening a compound inhibiting the induction of neuronal cell death associated with APP activation, the method

comprising:

(a) contacting a compound inducing APP activation and a test sample with a neuronal cell expressing an APP that induces the death of the cell when activated,

5 (b) detecting the death of the neuronal cell, and

(c) selecting a compound inhibiting the induction of the death of the neuronal cell;

(19) the method of (18), wherein the neuronal cell is the neuronal cell of any one of (1) to (4);

10 (20) the method of (18), wherein the neuronal cell is a primary cultured cell derived from a brain cortex neuron;

(21) the method of any one of (18) to (20), wherein the compound inducing APP activation is an antibody that binds to an APP;

15 (22) the method of (21), wherein the antibody is an antibody that binds to the extracellular region of an APP;

(23) a method for screening a compound inhibiting or enhancing the induction of neuronal cell death associated with APP activation, the method comprising:

20 (a) contacting a compound inducing the expression of an active APP mutant and a test sample with the neuronal cell of any one of (5) to (8),

(b) detecting the death of the neuronal cell, and

(c) selecting a compound inhibiting or enhancing the induction of the death of the neuronal cell;

25 (24) a kit for screening a compound inducing neuronal cell death or a compound inhibiting or enhancing the induction of neuronal cell death, the kit comprising the neuronal cell of any one of (1) to (8);

(25) an agent for inducing neuronal cell death, the agent comprising as an active ingredient a compound inducing neuronal cell death associated with APP activation;

30 (26) the agent of (25), wherein the compound is an APP agonist;

(27) the agent of (26), wherein the APP agonist is an antibody that binds to an APP;

35 (28) the agent of (27), wherein the antibody is an antibody that binds to the extracellular region of an APP;

(29) an inhibitor of neuronal cell death, which comprises as

an active ingredient a compound inhibiting the induction of neuronal cell death associated with APP activation;

(30) the inhibitor of (29), wherein the compound is an APP antagonist;

5 (31) the inhibitor of (29) or (30), wherein the inhibitor is an agent for preventing or treating a disease caused by neuronal cell death; and

(32) the inhibitor of (31), wherein the disease is Alzheimer's disease.

10 The present invention provides a method for inducing neuronal cell death associated with APP activation.

An embodiment of the inventive method for inducing cell death is a method comprising contacting a compound inducing APP activation with a neuronal cell expressing an APP that induces the death of the
15 cell when activated. There is no particular limitation on a cell to be used in the method, as long as the cell is a neuronal cell and its death is inducible by the activation of APP being present in the cell. It is preferred to use the cell in which the expression level of an APP has been enhanced by introducing a foreign DNA encoding
20 the APP into the cell for the purpose of efficient induction of cell death by an APP activator. Vectors to be used for APP expression include, for example, pCDNA (C.D. Funk et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5638-5642), pECE (D.O. Morgan et al., 1987, Nature, 329: 301-307), SR α (T. Takahashi et al., 1996, Lab. Invest., 74: 827-834),
25 and others. The introduction of a vector into cells is achieved, for example, by co-transfecting the vector with the neomycin-resistance gene by utilizing lipofection method. The selected cells are cloned by limiting dilution method. The cloning is conducted by using the expression level of APP as an indicator to provide APP-overexpressing
30 neuronal cell lines. There is no particular limitation on the expression level of APP in cells, as long as cell death is effectively induced by an agent for inducing cell death associated with APP activation. For example, when a neuronal cell line (for example, F11 cell) expressing a foreign APP is used, the expression level is
35 preferably 2 to 100 times as much as that of the endogenous APP, more preferably 5 to 50 times, further preferably 10 to 30 times, yet further

preferably about 20 times. It is possible to appropriately control the expression level of an APP by altering the type of a promoter used or the number of copies of the gene to be introduced.

In the present invention, it is possible to use not only cells expressing the foreign APP but also cells expressing merely endogenous APP, as long as cell death is sufficiently induced by APP activator such as an APP agonist. For example, it is possible to use primary cultured cells derived from brain cortex. In the present invention, cells treated with a differentiation-regulating substances such as retinoic acid are also usable to enhance the expression of endogenous APP.

APP expressed in these cells is a normal APP. In the present invention, "normal APP" means not only the wild-type APP but also APP mutants that are functionally equivalent to the natural one. The term "functionally equivalent to the wild-type APP" herein means having the function of inducing cell death equivalent to that of the wild-type APP.

There is no particular limitation on an APP that is expressed in a cell, as long as the APP is capable of inducing cell death by the treatment of an APP activator. A variety of APPs (members belonging to the APP family, including APLP1 and APLP2) are assumed to be usable for this purpose. Members belonging to the APP family include, for example, mouse APP (K. Yoshioka et al., 1991, Biochem. Biophys. Res. Commun., 178: 1141-1146), human APLP2 (W. Wasco et al., 1993, Nat. Genet., 5: 95-100), mouse YWK-II (Y. C. Yan et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2405-2408), *Drosophila melanogaster* ALPP (D.R. Rosen et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2478-2482), mouse APLP1 (S. Zhong et al., 1996, Genomics, 32: 159-162). A preferred example of a protein belonging to the APP family is APP₆₉₅. APP includes APP mutants as well as the wild-type APP.

In the present invention, there is no particular limitation on the type of APP activator to be used for inducing cell death; for example, an antibody recognizing an APP and, preferably, an antibody recognizing the extracellular region of an APP is usable.

Neuronal cells to be used in the present invention include, for example, cells of nervous system, cells derived from cells of nervous

system, and neural progenitor cells. For example, such cells include neuroblastoma, pheochromocytoma, teratoma, hybrid cells prepared from cells of nervous system, and embryonic germ cell. In the present invention, it is also possible to use neuronal cell lines such as
5 F11 cell, PC12 cell (L.A. Greene and A.S. Tischler, 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 2424-2428), NTERA2 cell (J. Skowronski and M. F. Singer, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6050-6054), and SH-SY5Y cell (L. Odelstad et al., 1981, Brain Res., 224: 69-82).

In the present invention, as long as cell death is induced by
10 the treatment of APP activator, the cell is not restricted to neuronal cells expressing human-derived APP but include, for example, neuronal cells expressing any APP (including all members of the APP family) of other organisms such as vertebrates, e.g., other mammals, amphibian, and fish; and invertebrates including *Drosophila* and *Caenorhabditis*
15 *elegans*.

In the inventive method for inducing cell death, "cell death is induced" means not only that the death event takes place in all the cells but also that the death is significantly induced among the cells. When the cells are treated with an APP activator and the death
20 is induced under optimal conditions, the cell mortality rate is preferably 50% or higher, more preferably 75% or higher, and most preferably 90% or higher. The cell mortality rate can be altered depending on the expression level of APP, the type and amount of APP agonist, duration of the treatment, etc. Those skilled in the art
25 can appropriately select the expression level of APP, and the type and amount of APP agonist, to significantly induce cell death.

In the present invention, it is preferred that cell death is hardly or not induced without the action of any agent capable of inducing cell death associated with APP activation but the death is significantly
30 induced with the action of the inducer. For example, APP₆₉₅ is introduced into F11 cell, which is a hybrid cell between rat primary cultured cell of dorsal root ganglion and mouse neuroblastoma N18TG2 (D. Platika et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3499; T. Yamatsuji et al., 1996, Science, 272: 1349). Without the action of
35 the monoclonal antibody used as APP agonist, the death is hardly induced in the cell expressing APP₆₉₅ at about 20 times higher level as compared

with the parental F11 cell, but the action of the antibody at a definite or higher concentration results in the induction of the death in almost all the cells.

Another embodiment of the inventive method for inducing cell death is a method comprising contacting a compound inducing the expression of an active APP mutant with a neuronal cell which inducibly expresses the active APP mutant that can induce the death of the cells.

In the present invention, the term "active APP mutant" means an APP of which amino acid sequence has been modified to ligand-independently express APP activity and, specifically, means an APP mutant having the activity of inducing neuronal cell death even in the absence of the ligand. Such APP includes APP mutants of familial Alzheimer's disease (FAD-APP). Known FAD-APP includes APP₆₉₅ mutant having a substitution of Ile, Phe, or Gly for Val at position 642, and another APP₆₉₅ mutant having a substitution of Asn for Lys at position 595 and a substitution of Leu for Met at position 596. Other mutants are also usable in the present invention as long as they have the activity as the active APP mutant. Mutations in the active APP mutants may be spontaneous mutations or artificially introduced mutations. Further, the origin of active APP mutants is not restricted to human; APPs derived from a variety of animals can be used in the present invention.

A neuronal cell inducibly expressing an active APP mutant can be prepared by any of various methods. For example, it is possible to prepare such neuronal cells by introducing a vector containing a DNA encoding an active APP mutant downstream of an inducible promoter into the cells. Usable promoters are, for example, metallothionein promoter, which is induced mainly by heavy metal ions, and tetracycline-inducible promoter, which is induced by tetracycline.

Further, nuclear receptors are thought to be utilized for indirect induction of the active APP mutant expression. In an embodiment of this method, a neuronal cell which contains a vector comprising a DNA encoding a nuclear receptor and a vector comprising a DNA encoding an active APP mutant that is functionally connected downstream of a responsive element for the nuclear receptor is first prepared. The nuclear receptor functions as a transcription factor

by binding to its ligand. When the prepared cell is reacted with the ligand, first, the ligand and the nuclear receptor expressed bind to each other to form a complex, and subsequently the complex binds to the nuclear-receptor responsive element. Then the complex
5 functions as a transcription factor and induces the expression of the DNA encoding the active APP mutant downstream of the responsive element. At the final step, the expression of the active APP mutant induces the death of the neuronal cell expressing active APP mutant.

There is no particular limitation on the type of nuclear receptor
10 used in the method. An example for the receptor is ecdysone receptor (Shuman, S., 1994, J. Biol. Chem. 269: 32678-32684). For example, ecdysone receptor, which is activated by binding with ecdysone, is first expressed together with retinoid X receptor in a cell. Subsequently, the active APP mutant gene is expressed by using cDNA
15 encoding active APP mutant that is inserted downstream of an ecdysone responsive element. Inducible expression of active APP mutant by ecdysone can be achieved by using the obtained cell line. An inducible expression system using Cre in combination with loxP can also be used.

Usable neuronal cells in this method are the same as those in
20 the above-mentioned system of inducing neuronal cell death by the APP activator.

The preparation of vectors for the expression of nuclear receptor and active APP mutant and introduction of the vectors into cell are achieved by using known genetic engineering techniques.

25 In the inventive vector containing a DNA encoding an active APP mutant functionally connected downstream of a responsive element for the nuclear receptor, "functionally connected" means that a DNA encoding an active APP mutant is connected downstream of a responsive element for the nuclear receptor to secure the expression the mutant.

30 In this induction system of neuronal cell death using an active APP mutant, "cell death is induced" means not only that the death event takes place in all the cells by the induction of an active APP mutant expression but also that the death is significantly induced among the cells. The cell mortality rate can be altered depending
35 on the type and the expression level of active APP mutant, duration of the expression, etc. These can be appropriately controlled. When

the death is induced by inducing the expression of active APP mutant under optimal conditions, the mortality rate is preferably 50% or higher, more preferably 75% or higher, and most preferably 90% or higher.

5 The present invention also provides a method for screening an agent inducing cell death associated with APP activation. In this screening method, the cell is contacted with not the APP activator but instead a desired test sample of which activity of inducing cell death associated with APP activation is to be detected; the cell death
10 inducing activity of the test sample is detected; and a compound having the activity is selected by using the above-mentioned cell death induction system using APP activation.

Specifically, the screening method comprises: (a) contacting a test sample with a neuronal cell expressing an APP that induces
15 the death of the cell when activated; (b) detecting the death of the neuronal cell; and (c) selecting a compound inducing the death of the neuronal cell.

The test sample used for the screening includes, for example, purified proteins (including antibodies), expression products from
20 gene libraries, synthetic peptide libraries, cell extracts, cell culture supernatants, libraries of synthetic low-molecular-weight compounds, natural materials such as soil, and solutions containing substances released from bacteria such as culture broth of mycobacterium; but it is not limited to only these examples. Depending
25 on the type of test sample, the contact of test sample with cells can be achieved by adding the test sample to cell culture medium, introducing the test sample into cells (including gene transfer), etc. The detection of cell death can be carried out by the methods as described in Examples. If the result of detection shows significant
30 induction of cell death, the test sample used in the screening can be judged to be a candidate for the agent inducing neuronal cell death.

So far, there is no known naturally occurring APP agonist. The screening of naturally occurring APP agonists can be conducted by using the screening method. For example, it is possible to isolate
35 and identify the gene encoding a protein possibly functioning as an APP agonist or ligand *in vivo*, when an expression library of

brain-derived cDNA is used as a test sample.

Further, when the screening is carried out by using extract from cells of brain as a test sample and the activity of inducing cell death is detected in the sample, the test sample is fractionated and
5 further screened to finally specify as a single compound, which is a constituent of the test sample having the activity of inducing cell death.

In the signal transduction associated with neuronal cell death, there can be many action sites of the compound obtained by the screening.
10 For example, the compound may act directly on APP, or a signal preceding or following APP. The compound that directly acts on APP and induces cell death is particularly called APP agonist in the present invention. APP agonist can be any of substances capable of inducing cell death, as long as the substance can act on cells to activate APP and activated
15 APP induces the death of the cells. For example, an antibody recognizing the extracellular region of APP can be a candidate for APP agonist. As shown in Examples, such antibodies include α 1680 antibody (refer to Examples) and Alz90 antibody (Boehringer Mannheim; Code No.1381466), which are monoclonal antibodies recognizing the
20 extracellular region of APP₆₉₅. There is no particular limitation on the type of antibody. Preferably, monoclonal antibody is used. The monoclonal antibody includes chimeric antibody, humanized antibody, and human antibody. The antibody further includes not only complete antibody molecule but also the Fab fragment, F(ab')₂ fragment, single
25 chain Fv (scFv), and the like. These types of antibodies can be prepared according to methods known to those skilled in the art. Antibodies thus prepared are used as APP agonists for inducing cell death. APP agonist can also be a peptide or any other compound. APP agonist may be a naturally occurring or artificially synthesized compound.

30 Furthermore, the present invention provides a method for screening an inhibitor for neuronal cell death associated with APP activation. In an embodiment of the screening method, the cell is contacted with the APP activator and a desired test sample of which activity of inhibiting the induction of cell death associated with
35 APP activation is to be detected; the activity for the test sample to inhibit the induction of cell death is detected; and a compound

having the inhibitory activity is selected, by using the above-mentioned cell death induction system using APP activation. Specifically, the screening method comprises: (a) contacting a compound inducing APP activation and a test sample with a neuronal cell expressing an APP that induces the death of the cell when activated; (b) detecting the death of the neuronal cell; and (c) selecting a compound inhibiting the induction of the death of the neuronal cell. Common features characteristic of sporadic Alzheimer's disease are as follows: (1) the cell death is associated with APP; (2) the APP is not a mutant; and (3) the cell death takes place in a neuron-specific manner. The neuronal cell death that takes place in this screening system shares all the features, and thus the cell death can be used suitably as a model for neuronal cell death associated with sporadic Alzheimer's disease. Because of this, compounds given by the screening are highly possible to be candidates for drugs for general Alzheimer's disease. The S/N ratio of cell death is extremely high and the procedure used is simple in this system. Accordingly, the system can be utilized as a new high-throughput system for rapid selection of antagonistic agent for Alzheimer's disease.

In a preferred embodiment of the screening method, an APP₆₉₅ cDNA (I, Nishimoto et al., 1993, Nature 362: 75) is inserted into an expression plasmid and then introduced into neuronal cells (for example, F11 cell). The cells into which APP-expression plasmid has been introduced are selected and then an APP activator, such as APP agonist, is allowed to act on the cells. Efficient induction of cell death should be confirmed. Compounds inhibiting the induction of cell death are selected by acting the APP activator on the thus-obtained cells in the presence of a test sample.

The test sample used for the screening includes, for example, purified proteins, expression products from gene libraries, synthetic peptide libraries, cell extracts, cell culture supernatants, libraries of synthetic low-molecular-weight compounds, natural materials such as soil, antisense nucleic acids, and ribozymes; but it is not limited to only these examples.

Depending on the type of the test sample, the contact of the test sample with cells can be achieved by adding the test sample to

cell culture medium, introducing the test sample into cells (including gene transfer), etc. The detection of cell death can be carried out by the methods as described in Examples. If the result of detection shows significant induction of cell death, the test sample used in the screening can be judged to be a candidate for the agent for inhibiting neuronal cell death. The inventive inhibitor includes not only the inhibitor that completely inhibits the cell death but also the inhibitor that significantly lowers the cell mortality rate as compared with that in the absence of the inhibitor.

10 There is no particular limitation on the action site of the candidate compound for cell death inhibitor selected by this screening. The compound may directly act on APP, or a signal preceding or following APP in the APP-mediated signal pathway for cell death. For example, the compound that acts upstream of APP includes a compound that inhibits the binding of APP agonist or the like, which activates APP, to APP. Further, the candidate compound can be a compound that directly acts on APP and inhibits the binding of APP agonist, or a compound having the activity of preventing the APP activation even when APP agonist binds to APP. The compound can also be a compound blocking cell death signal transduction following APP.

The present invention further relates to a method for screening an inhibitor or enhancer of neuronal cell death associated with APP activation, the method in which the system where cell death is induced by inducibly expressing an active APP mutant. As describe above, active APP mutants were found in familial AD cases, and therefore the cell line can be a suitable model for neuronal cell death in familial AD. The screening method comprises: (a) contacting a compound inducing the expression of an active APP mutant and a test sample with a neuronal cell inducibly expressing the active APP mutant that induces the death of the cell; (b) detecting the death of the neuronal cell; and (c) selecting a compound inhibiting or enhancing the induction of the death of the neuronal cell.

The test sample used for the screening includes, for example, purified proteins, expression products from gene libraries, synthetic peptid libraries, cell extracts, cell culture supernatants, libraries of synthetic low-molecular-weight compounds, natural materials such

as soil, antisense nucleic acids, and ribozymes; but it is not limited to only these examples.

Depending on the type of the test sample, the contact of the test sample with cells can be achieved by adding the test sample to cell culture medium, introducing the test sample into cells (including gene transfer), etc. The detection of cell death can be carried out by the methods as described in Examples. When the result of detection shows significant inhibition of cell death induction, the test sample used in the screening can be judged to be a candidate for the agent for inhibiting neuronal cell death. The inventive inhibitor includes not only the inhibitor that completely inhibits the cell death but also the inhibitor that significantly lowers the cell mortality rate as compared with that in the absence of the inhibitor. Alternatively, when the result of detection shows significant enhancement of cell death induction, the test sample used in the screening can be judged to be a candidate for the agent enhancing neuronal cell death. The inventive enhancer may be an enhancer that significantly increases the cell mortality rate as compared with that in the absence of the enhancer.

It is possible to obtain APP antagonists or compounds blocking the cell death signal following APP sequence by the screening according to the present invention. These compounds can be candidates for drugs for familial AD and are also thought to be used for treating and preventing a variety of diseases including general AD. Further, the screening of the present invention can give compounds enhancing APP-mediated cell death signaling. This screening system can be utilized to test the adverse effects of drugs applied to the nervous system. Specifically, it can be determined whether or not a drug has the adverse effect of worsening neuronal cell death by using the above-mentioned screening system. The system can be used to eliminate drugs having such an adverse effect.

The cell death inhibitor of the present invention is useful as a drug to treat diseases caused by the cell death and such associated with APP. The compound that binds to APP and inhibits APP activation is particularly called APP antagonist in the present invention. Specific inhibition of cell death associated with APP activation can

be achieved by using APP antagonist. Such inhibitors are particularly useful as drugs to treat a variety of diseases caused by APP activation.

There is no particular limitation on the type of disease for which the inhibitor is used, as long as the inhibition of cell death associated with APP or the related-molecules is effective for the treatment of the disease. Such diseases include, for example, Alzheimer's disease. Previous studies have revealed that neuronal cell death takes place in Alzheimer's disease (I. Nishimoto et al., 1997, *Adv. Pharmacol.*, 41: 337-368). The cell death has been suggested to be involved in a certain activation of APP (I. Nishimoto et al., 1998, *Neurobiol. Aging.*, 19: S33-S38). Because of this, the inventive cell death inhibitor is expected to be utilized as a drug to inhibit neuronal cell death in Alzheimer's disease. With the compound, it is also possible to prevent, in addition to Alzheimer's disease, for example, diseases caused by neuronal cell death induced by cerebral ischemia (T. Kirino, 1982, *Brain Res.*, 239: 57-69). Other target diseases, which can be treated or prevented by the inhibitor, are Parkinson's disease with dementia (M. H. Polymeropoulos et al., 1997, *Science*, 276: 2045-2047), diffuse Lewy bodies (M.G. Spillantini et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6469-6473), dementia associated with Down's syndrome, and so on. Further, APP-related molecule, APLP1, has been reported to be a causative gene for congenital nephrotic syndrome (Lenkkeri, U. et al., 1998, *Hum. Genet.* 102: 192-196). Thus, renal diseases such as nephrotic syndrome can also be targets of the treatment and prevention using the inhibitor.

When the inventive cell death inhibitor is a protein or gene, a DNA encoding the protein or a cDNA or the like corresponding to the gene is inserted into an appropriate expression vector. The vector is introduced into a target cell, thereby achieving the inhibition of cell death associated with APP activation. There are many usable vector systems, which are known to those skilled in the art.

The inventive cell death inhibitor can be an antibody. There is no particular limitation on the type of antibody; it includes monoclonal antibody, chimeric antibody, humanized antibody, and human antibody. The antibody further includes not only complete antibody molecule but also the Fab fragment, $F(ab')_2$ fragment, single chain

Fv (scFv), and the like. These types of antibodies can be prepared according to methods known to those skilled in the art. Antibodies thus prepared are useful for the diagnoses of diseases caused by neuronal cell death, treatment with antibody, etc. From the viewpoint of antigenicity, humanized antibody or human antibody is preferably used for the treatment with antibody.

When the inventive cell death inhibitor is a peptide, it may be modified to improve its cell membrane permeability.

When the above-mentioned compounds inhibiting or enhancing neuronal cell death are used as pharmaceuticals, these compounds can be administered to patients directly or after formulated by known pharmaceutical methods. For example, the compound to be administered is appropriately formulated with a pharmaceutically acceptable carrier or medium, specifically, sterile water or physiological saline, vegetable oil, an emulsifier, a suspending agent, a detergent, a stabilizer, or the like.

Depending on the characteristics of the compound, the administration to a patient can be carried out, for example, percutaneously, intranasally, transbronchially, intramuscularly, intravenously, intrathecally, intraventricularly, or orally. The dose is altered depending on the age, weight, and symptom of each patient, the method of administration, and so on; a suitable dose can be appropriately chosen by those skilled in the art. Further, if the compound can be encoded by a DNA, it is possible to conduct gene therapy using the DNA inserted into a vector for gene therapy. The dose and method of administration are altered depending on the weight, age, symptom of each patient, and such; a suitable dose and an administration method can be appropriately chosen by those skilled in the art.

The present invention further provides a kit for screening a compound inducing neuronal cell death or a compound inhibiting or enhancing the induction. The kit for screening a compound inducing neuronal cell death contains a neuronal cell expressing the above-mentioned foreign APP that can induce the death of the cell when activated.

Further, the kit for screening compounds inhibiting or enhancing

the induction of neuronal cell death contains (i) a neuronal cell expressing the above-mentioned foreign APP that can induce the death of the cell when activated, or (ii) a neuronal cell inducibly expressing the above-mentioned active APP mutant that can induce the death of the cell.

When the kit contains a neuronal cell expressing a foreign APP that can induce the death of the cell when activated, the kit may further contain a compound inducing the activation of the above-mentioned APP.

Further, when the kit contains, as a neuronal cell inducibly expressing an active APP mutant that can induce the death the cell, a neuronal cell which contains a vector comprising a DNA encoding a nuclear receptor and a vector comprising a DNA encoding an active APP mutant that is functionally connected downstream of a responsive element for the nuclear receptor, and which expresses the active APP mutant when induced by contact of a ligand with the nuclear receptor, the kit may further contain a ligand to the nuclear receptor.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows the expression of APP₆₉₅ in F11, F11/APP, and Bu695 cells analyzed by Western blotting. In this figure, antibodies used are Alz90 antibody (5 µg/ml) in panel 1; α1680 antibody (0.5 µg/ml) in panel 2; and 22C11 antibody (5 µg/ml) in panel 3.

Figure 2 shows a time course of the death of F11/APP cells treated with anti-APP antibody. The closed symbols indicate total cell counts; the open symbols, the number of viable cells. Circle denotes the treatment with α1680 antibody (0.5 µg/ml); square, Alz90 antibody (1 µg/ml); and triangle, nonspecific IgG (1 µg/ml).

Figure 3 shows a time course of the death of F11/APP cells treated with anti-APP antibody. The closed symbols indicate F11 cell; the open symbols, F11/APP cell. Circle denotes the treatment with α1680 antibody (0.5 µg/ml); square, Alz90 antibody (1 µg/ml); diamond, nonspecific IgG (1 µg/ml).

Figure 4 shows the effect of antibody absorption on F11/APP cell death. The death of F11/APP cell was assayed with antigen-absorbed α1680 antibody (absorbed α1680) or mock-absorbed α1680 antibody (mock

absorbed α 1680). The values indicated in the histogram were mean values and standard deviations (SD) obtained in 3 to 10 independent experiments. The small inset indicates the results of Western analysis of the absorbed α 1680 antibody sample (lane 2) and mock-absorbed α 1680 antibody sample (lane 1) treated with HRP-labeled anti-rat IgG antibody. In this inset, the position marked with "heavy chain" corresponds to α 1680 antibody.

Figure 5 shows dose response curves of purified anti-APP antibodies in F11/APP cells. F11/APP cells were treated with various concentrations of α 1680 antibody (closed square), Alz90 antibody (open square), Jonas antibody (closed circle), or nonspecific IgG (open circle), and the cell mortality rates were measured after 72 hours.

Figure 6 shows schematic illustrations of two possible models for the death induction of F11/APP cell by anti-APP antibody. In the model shown in the left illustration, the anti-APP antibody activates the cell death machinery by acting on cell-surface APP. In the model illustrated at the right, the anti-APP antibody absorbs soluble APP (sAPP) and as a consequence the cell death takes place. In this figure, the mark " \perp " means inhibition or suppression.

Figure 7 shows the effect of culture medium replacement (elimination of sAPP) on the death of F11/APP cell. The media were replaced at 1-hour intervals during 12 hours to test the cell death induction by sAPP elimination. The experimental conditions are indicated schematically above the histogram. In the upper part, "72 hr Alz90" indicates the treatment with Alz90 antibody for 72 hours; "72 hr IgG" indicates the treatment with nonspecific IgG for 72 hours; "12 hr washing" indicates that medium replacement was carried out at 1-hour intervals and thus 12 times in total; "60 hr Ham F-12" means that cells were cultured without antibody but with a medium alone for 60 hours; and "12 hr Alz90" indicates the treatment with Alz90 antibody for 12 hours. The bottom histogram shows the results obtained under the four experimental conditions.

Figure 8 shows the cell death-inducing ability of RMSQ peptide and SRQM peptide. F11/APP cells were treated with lower (10 nM) or higher (100 nM) concentration of each peptide. The cell mortality rate was measured after 72 hours. This figure also contains the results

of negative (IgG; 1 μ g/ml IgG) and positive (Alz90; 1 μ g/ml Alz90 antibody) controls.

Figure 9 shows experimental results of cell death induction by using insert wells with microfilter. The experimental conditions are schematically indicated in the upper part of the figure. From the left, "IgG + no beads" indicates a negative control experiment using nonspecific IgG but not the beads; "Alz90 antibody + no beads" indicates a positive control using Alz90 antibody but not the beads; "Alz90 antibody + protein G beads" indicates an experiment using an insert well packed with Alz90 antibody-bound protein G beads; "Alz90 antibody + glutathione beads" indicates a control experiment where, instead of protein G beads, glutathione beads were incubated with Alz90 antibody; and "Glutathione beads alone" indicates a control experiment using an insert well packed with glutathione beads alone. The results obtained by the measurements of cell death are shown in the bottom part of this figure.

Figure 10 shows representative micrographs of the cells adhered to the respective wells, which were subjected to the treatment with "IgG + no beads" (IgG), "Alz90 antibody + no beads" (Alz90), "Alz90 antibody + protein G beads" (Alz90 + protein G beads), or "Alz90 antibody + glutathione beads" (Alz90 + glutathione beads) as shown in Figure 9. The cells were observed by using a phase-contrast microscope.

Figure 11 shows TUNEL staining patterns of F11/APP cells, the death of which was induced by the anti-APP antibody. Marked with "IgG" is a pattern of F11/APP cells treated with nonspecific IgG (1 μ g/ml); " α 1680" is a pattern of F11/APP cells treated with α 1680 antibody (0.5 μ g/ml). The cells were TUNEL-stained 24 hours after the treatment. " α 1680 + DEVD-CHO" indicates the treatment with α 1680 antibody (0.5 μ g/ml) in the presence of 10 μ M Ac-DEVD-CHO; "UV" indicates F11/APP cells treated with UV (320 μ J/cm² x 10 seconds). The bright portions correspond to the nuclei where the fragmentation of chromosomal DNA took place.

Figure 12 shows analytical results for DNA laddering. F11/APP cells were treated with Alz90 antibody (1 μ g/ml) in the absence (-) or presence (DEVD-CHO) of Ac-DEVD-CHO for 24 hours, and then recovered to detect DNA laddering. The concentrations of Ac-DEVD-CHO used were

0.1, 1, 10, and 100 μM from the left.

Figure 13 shows nuclear morphology of F11/APP cells, the death of which was induced by the anti-APP antibody. F11/APP cells were treated with α1680 antibody and stained by TUNEL method. Nuclear compaction, cleavage, and fragmentation characteristic of apoptosis are observed.

Figure 14 shows the effect of tetrapeptide caspase inhibitors on the death of F11/APP cells induced by anti-APP antibody. F11/APP cells were treated with nonspecific IgG antibody (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), α1680 antibody (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), or Alz90 antibody (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the absence (-) or presence of each of 10 μM tetrapeptides. The cell mortality was measured after 72 hours.

Figure 15 shows the verification of DNA laddering by the anti-APP antibody in a glioma cell line Bu695 stably overexpressing APP₆₉₅. Bu695 cells were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nonspecific IgG or Alz90 antibody (Anti-APP), and the assay for the laddering of DNA contained in the cells was conducted after 24 hours. In an experiment for positive control, Bu695 cells were UV-irradiated (320 $\mu\text{J}/\text{cm}^2 \times 10$ seconds). The sample (UV) after 24 hours was also assayed. In addition, Alz90 antibody-treated F11/APP cells were assayed for a control.

Figure 16 shows TUNEL staining patterns of Bu695 cells. Bu695 cells were treated with nonspecific IgG (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ("IgG" in the figure), Alz90 antibody (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ("Alz90" in the figure), or purified α1680 antibody (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (" α1680 " in the figure) for 24 hours, and then subjected to TUNEL staining. In the pattern marked with "UV," Bu695 cells were UV-irradiated (320 $\mu\text{J}/\text{cm}^2 \times 10$ seconds) and stained by TUNEL method. Similar experiments were conducted in triplicate and representative results are shown in this figure.

Figure 17 shows the effect of APP-specific antibody on primary cultured cortical neurons. Mouse primary cultured cortical neurons were incubated with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nonspecific IgG (a, c) or Alz90 antibody (b, d) for 72 hours. Similar but independent experiments were conducted in quadruplicate, and representative results of phase contrast micrographs are shown in a and b. Similarly treated cells were stained with Hoechst 33258, and the results are shown in c and d. Magnifications in a and c are the same as those in b and d, respectively.

Figure 18 shows the TUNEL staining patterns of primary cultured cortical neurons treated with APP specific antibody. The primary cultured cortical neurons were incubated with 2 μ g/ml nonspecific IgG or Alz90 antibody in the presence or absence of 10 μ M Ac-DEVD-CHO or cell-impermeable Ac-DEVD for 24 hours. Then, DNA fragmentation was analyzed by TUNEL staining. Independent but similar experiments were conducted in triplicate and representative results are shown in this figure.

Figure 19 shows the expression of APP₆₉₅ in FAD-APP-expression inducible cells (V642I). F11/EDXR/V642I cells were cultured in the presence (+) or absence (-) of 20 μ M Muristerone (Invitrogen) for 48 hours, and then subjected to immunoblotting using anti-Alz90 antibody (5 μ g/ml). The figure shows a typical result of at least 8 experiments.

Figure 20 shows results of incubation of F11/EDXR/V642I cells with (+) or without (-) 20 μ M ecdysone in the presence (+) or absence (-) of 10 μ M Ac-DEVD-CHO for 48 hours. The cell mortality rate was measured with trypan blue-exclusion assay. The figure shows typical results of at least 8 experiments.

Figure 21 shows micrographs of F11/EDXR/V642I cells cultured in the presence (bottom panel) or absence (top panel) of 20 μ M Muristerone for 48 hours. The figure shows typical results of at least 8 experiments.

Figure 22 shows Hoechst-33258 stained patterns of F11/EDXR/V642I cells cultured in the presence (bottom panel) or absence (top panel) of 20 μ M Muristerone for 48 hours. The figure shows typical results of at least 8 experiments.

Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention is illustrated in detail below with reference to Examples, but is not to be construed as being limited thereto.

Example 1. Anti-APP monoclonal antibody

A monoclonal antibody, α 1680 antibody, was prepared as follows. ABgIII fragment containing APP1-591 (I. Nishimoto et al., 1993, Nature,

362: 75-79) was inserted into an expression vector containing a GST protein encoding sequence (F. Eckhardt et al., 1997, Mol. Cell. Neurosci., 9: 409-419) and introduced into *E. coli* (DH5 α) to produce a fusion protein of GST and APP1-591. The recombinant protein was purified and recovered by using glutathione beads (J.V. Frangioni and B.G. Neel, 1993, Anal. Biochem. 210: 179-187). The monoclonal antibody was prepared by using the fusion protein of GST and APP1-591 as an antigen according to a known method (C.J. Barnstable et al., 1978, Cell, 14: 9-20).

10 It was confirmed that α 1680 antibody did not recognize the recombinant GST although the antibody specifically recognized APP1-591, which covers most of the extracellular region of APP. In the present invention, unless otherwise stated, α 1680 antibody solution indicates 10-fold dilution of hybridoma culture medium containing 5 μ g/ml α 1680
15 antibody. Alz90 antibody is a mouse monoclonal IgG (Boehringer Mannheim; Code No.1381466) against the amino acid residue 511-608 of the extracellular region of APP.

Example 2. Preparation of neuronal cell expressing APP

20 The neuronal cell used was F11 cell. F11 cell is a hybrid cell between a neuronal cell derived from first dorsal root ganglion and a neuroblastoma N18TG2, and has characteristics of neuronal cell (D. Platika et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3499; T. Yamatsuji et al., 1996, Science, 272: 1349). F11 cell was cultured in a Ham
25 F-12 medium (Gibco) containing 18% fetal calf serum. A HindIII-BamHI fragment containing APP₆₉₅ cDNA (I. Nishimoto et al., 1993, Nature, 362: 75) was inserted into an expression vector pcDNA (C.D. Funk et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5638-5642). Together with pBabe/puro containing the puromycin-resistance gene (H. Zhao et al.,
30 1996, J. Invest. Dermatol. 106: 744-752), the resulting plasmid was introduced into F11 cells by lipofection method. The lipofection was carried out by using APP cDNA (9 μ g), pBabe/puro (1 μ g), and lipofectamine (10 μ l; Gibco) according to a method as described in a reference (T. Okamoto et al., 1996, EMBO J., 15: 3769). Cells were selected by using
35 14 μ g/ml puromycin, and 4 to 5 weeks after the selection, the resistant colonies were recovered. Subcloning was conducted by limiting

dilution method for the colonies exhibiting high-level expression of APP. The expression level was evaluated by immunoblot analysis using 5 µg/ml anti-APP monoclonal antibody 22C11 (T. Okamoto et al., 1995, J. Biol. Chem., 270: 4205).

5 The isolated APP-introduced F11 cells stably expressing the APP₆₉₅ (F11/APP) were cultured, and then cell homogenates (50 µg protein each) were prepared from F11/APP cells, the parental F11, and Bu695 cells (refer to Example 9). The homogenates were subjected to SDS-PAGE (10% gel), followed by immunoblotting with Alz90 antibody (5 µg/ml; 10 Figure 1, panel 1), α1680 antibody (0.5 µg/ml; panel 2), or 22C11 antibody (5 µg/ml; panel 3) (Figure 1). The results showed that F11/APP cells expressed APP₆₉₅ protein at a high level, and the level is about 20 times as much as that of the parental F11 cells.

Although the three types of anti-APP antibodies used recognize 15 different parts of APP, the three antibodies gave the signal at similar levels in F11/APP cell and Bu695 cell (Figure 1). (A band of 90 to 100 kDa, which was found in F11 cell only by immunoblot analysis with α1680 antibody, was not reproducible.)

20 Example 3. Induction of death of neuronal cell with introduced APP₆₉₅

F11/APP cell, into which APP₆₉₅ was introduced, and F11 cell were treated with α1680 antibody or Alz90 antibody. α1680 antibody is a monoclonal antibody against APP1-591, which covers most part of the extracellular domain of APP₆₉₅ protein.

25 F11/APP cells were plated on a dish in a Ham F-12 medium containing 18% fetal bovine serum. After 24 hours, the cells were washed and then the medium was replaced with a fresh Ham F-12 medium containing nonspecific IgG (1 µg/ml), α1680 antibody (0.5 µg/ml), or Alz90 antibody (1 µg/ml). Then, cell viability was measured by using trypan blue 30 exclusion as the indicator during the time course of incubation. The cells were not washed but pipetted gently to suspend in a medium without serum. 0.1% trypan blue dissolved in PBS was added to the cell suspension at a final concentration of 0.02%, and the resulting mixture was incubated at 37°C for 15 minutes. Then, the viability was measured 35 by using trypan blue exclusion as an indicator (Figure 2). The same experiments as shown in Figure 2 were also performed for F11/APP cell

and F11 cell. Based on the results, the cell mortality rate was represented by $(100 - \text{cell viability}) (\%)$ (Figure 3).

As shown in Figures 2 and 3, 72 hours after the antibody treatment, the death took place in 80 to 90% of antibody-treated F11/APP cell. Twenty-four hours after the treatment, nearly all the cells were observed to be viable, but 48 hours after the treatment, the mortality increased markedly. A similar experiment was carried out by using F11 cells stably carrying APP₆₉₅, which were different sets of cells from those used in Figures 2 and 3. The time course and the mortality of cells treated with α 1680 antibody were both similar to those in Figures 2 and 3. On the other hand, the death was hardly induced in F11/APP cells treated with nonspecific IgG even 72 hours after the treatment (Figures 2 and 3). In the results of nonspecific IgG treatment shown in Figure 2, the cell count increased after the treatment, and the saturated cell count slightly increased as compared with that prior to the treatment. This results from the freshly changed medium. Further, cell death was hardly induced (Figure 3) even when the parental F11 cells were treated with α 1680 antibody. To verify the reproducibility, independent sets of the same experiment as shown in Figures 2 and 3 were repeatedly conducted in triplicate or more; the results obtained were reproducible.

Example 4. Verification of specificity of α 1680 antibody to the induction of cell death

The following experiment was conducted, in order to verify that the induction of cell death by α 1680 antibody in Example 3 is specific to α 1680 antibody. The recombinant fusion protein of GST and APP1-591 produced in *E. coli* was mixed with glutathione-Sepharose, and the resulting mixture was incubated at room temperature for 8 hours to immobilize the fusion protein of GST and APP1-591 on glutathione beads. Each batch of glutathione beads with and without bound APP1-591 (500 μ l/tube each) was mixed with a solution of 5 μ g/ml α 1680 antibody, and the resulting mixture was incubated at room temperature for another 8 hours. The beads were precipitated by centrifugation, and the supernatant was recovered. The antibody solution obtained was diluted 10 times in a similar manner as shown in Example 3, and then used

in the assay for F11/APP cell. Antibody incubated with APP1-591-bound glutathione beads is referred to as "absorbed α 1680," and antibody incubated with control glutathione beads is referred to as "mock-absorbed α 1680." Ten-fold diluted "absorbed α 1680" or
 5 "mock-absorbed α 1680" was added to a medium containing F11/APP cells. After 72 hours, the cell mortality rate was measured (Figure 4). The values shown in the graph of Figure 4 are mean values and the standard deviations (SD), which were obtained by repeatedly conducting 3 to 10 sets of independent experiments. An aliquot of the supernatant
 10 was transferred onto a membrane. After the blocking, the membrane was analyzed by immunoblotting with HRP-labeled anti-rat immunoglobulin antibody (small inset of Figure 4). The signal was detected by using ECL Western Blotting Detection System (Amersham). In the small inset of Figure 4, lane 1 corresponds to "mock-absorbed
 15 α 1680" and lane 2 corresponds to "absorbed α 1680."

As seen in Figure 4, "mock-absorbed α 1680" antibody exhibited the cell death-inducing activity at a comparable level to that of unabsorbed α 1680 antibody, but "absorbed α 1680" antibody hardly induced cell death. The results of immunoblot analysis showed that
 20 antibody was efficiently absorbed from the antibody sample by the absorption treatment (lane 2 in the small inset of Figure 4). Based on the above-described results, it can be confirmed that not the buffer to be used for antibody solution or other constituents or contaminants, but α 1680 antibody induced the death of F11/APP cell.

25

Example 5. Examination of the importance of antibody recognizing the APP extracellular region

It was verified that the recognition region of antibody is important in the induction activity of cell death, by using multiple
 30 antibodies recognizing different regions of APP protein. The purified anti-APP antibodies used were α 1680 antibody, Alz90 antibody, and Jonas antibody (Boehringer Mannheim; Code No. 1584944). Jonas antibody is a mouse monoclonal antibody prepared against the portion of amino acid residue 643-695 within the intracellular region of APP₆₉₅.

35

The culture medium of F11/APP cell was replaced by Ham F-12 media containing various concentration of purified anti-APP antibody.

Seventy-two hours after the treatment, cell mortality rate was measured. The result showed that α 1680 antibody induced the death of F11/APP cell with highest efficiency and the maximal efficiency was 90% or more (Figure 5). Seventy-two hours after the treatment with 0.5 μ g/ml antibody, the death was induced in most of the F11/APP cells. The cell-killing ability of Alz90 antibody was approximately as half as that of α 1680 antibody. Seventy-two hours after the treatment with 1 μ g/ml Alz90 antibody, the death was induced in about 90% of the cells. The time course profile of cell death induced by Alz90 antibody was essentially the same as that obtained by α 1680 antibody (Figure 5). Under the same conditions, death of the parental F11 cells could not be induced by α 1680 antibody nor by Alz90 antibody. Further, Jonas antibody, which is an antibody against the portion of amino acid residue 643-695 within the intracellular region of APP₆₉₅, was tested for the cell death. Contrasted to the results with the antibody against the extracellular region of APP, the results showed that death of F11/APP cell was hardly induced within a concentration range of the antibody up to 1 μ g/ml (Figure 5). In addition, the death of the parental F11 cells was not induced by Jonas antibody. These results revealed that the death of APP-expressing cells induced by anti-APP antibody could be ascribed to the action of the antibody on the extracellular region of APP.

Example 6. Examination of the mechanism in the action of anti-APP antibody

<1>

It has been believed that APP is expressed as a membrane-bound protein and then the extracellular region of APP is secreted as a soluble APP (sAPP) out of cell in the normal metabolism. The results of Example 5 raise the high possibility that the anti-APP antibody induces death of F11/APP cell by binding to the extracellular region of APP₆₉₅ protein expressed on the cell surface (Figure 6, the left schematic illustration). In this case, the anti-APP antibody acts on cell-surface APP and then activates the cell death machinery located in the cytoplasm. However, there is another possibility that the soluble APP (sAPP) secreted from F11/APP cell has the function of

preventing cell from the death but absorption of sAPP by the anti-APP antibody induces cell death. In this case, the anti-APP antibody absorbs soluble APP (sAPP) and this results in sAPP inactivation, which induces cell death; and finally the death of F11/APP cell is induced in an antibody-dependent fashion (Figure 6, the right schematic illustration). APP plays an opposite role in each of the above-mentioned two possibilities. APP activates cell death machinery in the left illustration of the same figure, but APP is associated with neuronal cell-protecting system in the right illustration of the same figure.

Concerning the latter possibility, it has been reported that sAPP has neuronal protection effect (J.M. Roch et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 7450; L.W. Jin et al., 1994, Neurosci., 14: 5461). Nonetheless, the possibility shown in the right schematic illustration of Figure 6 is thought to be excluded. One reason for this is as follows: cell viability was not increased in F11 cells overexpressing APP under a cell death-inducing stimulus, such as UV irradiation (the parental F11 cell was subjected to the same experiment as shown in Figure 16, in which F11/APP cell was subjected to UV irradiation; most of the parental F11 cells were killed by apoptosis after 24 hours, which was the same as found with F11/APP cells). Another reason is that the cells overexpressing APP were killed with high frequency by serum deprivation (for example, when treated with nonspecific IgG in the absence of serum, the cell mortality rate is higher in the APP-overexpressing cell than in the parental F11 cell, which is shown in Figure 3).

In order to further examine the above-described latter possibility, the following series of experiments were carried out.
<2>

First, the cells were repeatedly washed with media and soluble factors were removed to observe the effect of the removal. The medium of F11/APP cell was replaced by Ham F-12 medium without serum, and the replacement was repeated at 1-hour intervals during the first 12 hours; then the cells were incubated in Ham F-12 medium without serum for 60 hours (Figure 7; 12 hr washing). Assay for cell death was performed 72 hours after the start of the experiment. In other

experiments conducted, F11/APP cells were incubated in Ham F-12 medium containing 1 μ g/ml Alz90 antibody for 12 hours (Figure 7; 12 hr Alz90), for 72 hours (Figure 7; 72 hr Alz90), and the cells were incubated in Ham F-12 medium containing 1 μ g/ml nonspecific IgG for 72 hours (Figure 7; 72 hr IgG). The experimental conditions are illustrated above the panel in Figure 7.

F11/APP cells were treated with Ham F-12 medium containing Alz90 antibody for the first 12 hours, and then the medium was replaced with Ham F-12 medium without antibody. The culture was continued for further 60 hours. The death was induced in most of F11/APP cells; the efficiency was nearly identical to that obtained when the cells were treated with Alz90 antibody for 72 hours. Accordingly, it was clarified that the treatment with Alz90 antibody for 12 hours was sufficient for the anti-APP antibody to activate the cell death machinery of F11/APP cell. If the cell death induced by the anti-APP antibody were ascribed to the absorption of sAPP from the medium, the experimental results obtained here would indicate that the cell death could be induced by the removal of sAPP for the first 12 hours. Therefore, the medium was replaced with the fresh one at 1-hour intervals during the first 12 hours, that is, the medium replacement was repeated 12 times in total. Subsequently, the cells were cultured in Ham F-12 medium without antibody for 60 hours. By this procedure, every effect of soluble APP (sAPP) can be minimized for the first 12 hours. Seventy-two hours after the start of the experiment, the mortality rate increased very slightly in F11/APP cell as compared with the basal mortality rate induced by the nonspecific IgG (Figure 7); the number of cells killed was negligibly small as compared with that obtained when the cells were treated with the anti-APP antibody for 12 hours.

These results indicate that the death of F11/APP cell induced by the anti-APP antibody does not result from the elimination of soluble APP (sAPP). (The slight elevation of the mortality level with the washing treatment for 12 hours is thought to be ascribed to cell damage caused by repeated medium replacement.)

<3>

In the next step, a peptide, which has been reported to be an

sAPP inhibitor, was tested for its effect. A previous report describes that R³³⁰MSQ³³³ peptide, which corresponds to a sequence in the extracellular region of APP₆₉₅, cancels the neuron-protecting effect of sAPP, when used at a concentration of 10 nM (H. Ninomiya et al., 1993, J. Cell Biol., 121: 879). If the anti-APP antibody inactivated sAPP and thereby induced cell death, the addition of this RMSQ peptide into the medium should induce a similar effect. Then, RMSQ peptide or SRQM peptide was added to the medium at a lower (10 nM) or higher (100 nM) concentration, and the F11/APP cells were incubated for 72 hours. After the incubation, the cell mortality rate was measured (Figure 8). After synthesized, RMSQ peptide and SRQM peptide, in which the original RMSQ sequence was scrambled, were purified to 95% or greater purity. The purified ones were used in the experiment. The first and second columns from the left in Figure 8 correspond to a negative (1 µg/ml nonspecific IgG) and positive (1 µg/ml Alz90 antibody) controls, respectively.

As indicated in Figure 8, neither RMSQ nor SRQM could induce the death of F11/APP cell, when used in a concentration range up to 100 nM. These results also indicate that the cell-killing effect of the anti-APP antibody is not attributable to the blocking of sAPP.

<4>

An experiment in which Alz90 antibody was separated from F11/APP cells but in which the antibody was capable of being in contact with sAPP in medium was conducted, in order to confirm that the anti-APP antibody directly acts on the cell-surface APP. To achieve this purpose, Alz90 antibody (final concentration; 1 µg/ml) was pre-incubated with protein G-bound Sepharose (Pharmacia), and the resultants were packed into an insert well having a micropore filter on the bottom thereof. The insert well was integrated onto a well of 24-well plate containing cultured F11/APP cells on its bottom. A schematic illustration of the experimental outline is shown in the top panel of Figure 9. To secure the sufficient contact of the antibody-bound beads with the soluble APP, the culture plate was being shaken slowly (at 1 rpm) in a CO₂ incubator for the first 24 hours. After 72 hours, there were no beads that happened to come out of the insert well to any wells of the 24-well plate where the cells were cultured.

Seventy-two hours after the start of the incubation, the death of F11/APP cell was hardly induced in a bottom well on which the insert well had been placed (Figures 9 and 10). On the other hand, most of F11/APP cells were killed in a control well of which insert well
5 contained Alz90 antibody alone at the same final concentration but not the beads. In another control experiment, glutathione-Sepharose (Pharmacia), which is incapable of trapping the antibody, was incubated with Alz90 antibody (final concentration 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and then packed into an insert well, which was used as a control insert well. Most
10 of F11/APP cells were killed when cultured on a bottom well equipped with the control insert well. The mortality rate was similar to that obtained with the insert well containing Alz90 antibody alone but not the beads. Cell death was hardly observed with an insert well containing glutathione-Sepharose or nonspecific IgG (final
15 concentration; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

The insert well, which was used in this experiment, has a filter that has 3- μm pores. Therefore, soluble proteins can access to the Alz90 antibody-bound beads. On the other hand, the beads used in this experiment are incapable of passing through the pores, and as a
20 consequence Alz90 antibody bound on the beads cannot act on F11/APP cells under the given conditions. Indeed, Alz90 antibody was not detectable in a culture supernatant incubated with an insert well packed with Alz90 antibody/protein-G Sepharose. On the other hand, after incubated with Alz90 antibody/glutathione-Sepharose in an insert
25 well, the culture supernatant contained almost the same amount of Alz90 antibody as in the supernatant treated with an insert well containing Alz90 antibody alone but not the beads. These results imply that direct interaction of the anti-APP antibody with the cell-surface APP is essential for the induction of cell death.

30 From these results, together with the results shown in Example 6, it is concluded that each of these anti-APP antibodies functions as an agonistic ligand of APP and directly acts on the cell-surface APP, thereby inducing neuronal cell death.

Example 7. Analysis of death of F11/APP cell

<1>

In order to analyze the characteristics of death of F11/APP cell, which is induced by the anti-APP antibody, DNA fragmentation was detected by TUNEL staining method. Cells to be used in TUNEL assay were placed on a glass slide pre-coated with poly-D-lysine, and pre-cultured in Ham F-12 medium containing 18% fetal bovine serum and an antibiotic. The treatment with antibody was carried out in the absence of serum in the same manner as in Example 6.

F11/APP cells were treated with nonspecific IgG (1 μ g/ml) or α 1680 antibody (0.5 μ g/ml) in a medium for 24 hours. The sample was stained with FITC-labeled dUTP by TUNEL method (Y. Gavrieli et al., 1992, J. Cell Biol., 119: 493-501). F11/APP cells were also treated with α 1680 antibody (0.5 μ g/ml) in the presence of 10 μ M Ac-DEVD-CHO (Peptide Inc.) in the same manner, and then subjected to TUNEL staining. Alternatively, F11/APP cells were treated with ultraviolet-light (UV) irradiation (320 μ J/cm² x 10 seconds), followed by TUNEL staining (apoptosis is induced in the cell by UV irradiation). The experiment was repeated at least 3 times, and the representative examples are shown in Figure 11.

When F11/APP cells were treated with nonspecific IgG, TUNEL positive signals were not detectable on the nuclei of the treated cells (Figure 11; IgG). On the other hand, when treated with UV irradiation, DNA fragmentation was detected in almost all the F11/APP cells (Figure 11; UV). When the cells were treated with α 1680 antibody, DNA fragmentation was detected in the nuclei of 80 to 90% cells 24 hours after the treatment (Figure 11; α 1680). Further, Ac-DEVD-CHO, which is a cell-permeable inhibitor of intracellular caspases, inhibited the α 1680 antibody-induced DNA fragmentation (Figure 11; α 1680 + DEVD-CHO) (caspase has been reported to be associated with the progress of cell death classified as apoptosis (E. S. Alnemri, 1997, J. Cell. Biochem., 64: 33-42)). This suggests that, in F11/APP cell, the anti-APP antibody activates a genetic program for cell death classified as apoptosis, in which caspases are involved and chromatin fragmentation takes place.

<2>

Further, F11/APP cells were incubated with α 1680 antibody in a medium for 24 hours in the same manner. DNA laddering in F11/APP cell was investigated in the presence or absence of Ac-DEVD-CHO. DNA ladder of 180-bp intervals is a basic characteristic of apoptosis, and detection of such DNA ladder in an extracted DNA is important to determine whether or not the death is apoptotic (A.H. Wyllie, 1980, Nature, 284: 555). DNA laddering assay was carried out by using an ApopLadder Ex kit (Takara) according to the attached protocol.

F11/APP cells were incubated with Alz90 antibody (1 μ g/ml) in the absence (Figure 12; (-)) or presence of various concentrations of Ac-DEVD-CHO in a medium for 24 hours. DNA laddering was assayed. The Ac-DEVD-CHO concentrations used are 0.1, 1, 10, and 100 μ M from the left in the figure.

As indicated in Figure 12, 180-bp DNA ladder was found when F11/APP cells were treated with α 1680 antibody. Generation of the ladder is inhibited by Ac-DEVD-CHO. As the concentration of Ac-DEVD-CHO increased, the DNA laddering was strongly inhibited. These data showed that DNA fragmentation induced by the anti-APP antibody is an apoptotic event.

<3>

Further, the nuclear morphology of F11/APP cells treated with α 1680 antibody was observed by using TUNEL staining. Twenty-four to 36 hours after the treatment, nuclear morphology changes such as compaction, cleavage, and fragmentation took place in almost all the cells. All the phenomena are the features characteristic of apoptosis. Figure 13 shows the nuclei of α 1680 antibody-treated F11/APP cells stained by TUNEL method. The figure displays various features, namely nuclear compaction, cleavage, fragmentation, and such, which are typically found in the nuclei of cells in which apoptosis took place. Whereas the accurate timing of the morphological changes was different from experiment to experiment, the changes were generally induced 24 to 36 hours after the treatment with the anti-APP antibody.

Example 8. Effect of caspase inhibitor

In the next experiment, F11/APP cells were incubated with 1 μ g/ml

nonspecific IgG or Alz90 antibody in the presence or absence of 10 μ M Ac-DEVD-CHO or Ac-DEVD (without aldehyde modification at the C terminus) (DEVD-AMC, used in *in vitro* caspase substrate assay; Peptide Inc.) in a medium for 72 hours. The treated cells were stained with trypan blue to evaluate cell death. Unlike Ac-DEVD-CHO, Ac-DEVD is incapable of permeating through cell membrane and therefore does not act intracellularly. Thus Ac-DEVD does not inhibit caspase and as a result the compound does not suppress apoptosis. The treatment with 10 μ M Ac-DEVD-CHO or Ac-DEVD alone was conducted as a negative control. The results are shown in Table 1. The values indicated are mean values \pm SD in at least 5 sets of experiments. In this table, the asterisk "*" means that the cell death induced by Alz90 antibody is inhibited at a significant level of 1% in Student's t test and the mark "§" means that the cell death is not inhibited at a significant level of 1% in Student's t test.

Table 1

Mortality rate of F11/APP cell (%)

20	IgG	5.0 \pm 0.5
	Alz90	87.0 \pm 2.0
	Alz90+Ac-DEVD-CHO	25.0 \pm 6.4*
25	Alz90+Ac-DEVD	79.0 \pm 5.2§
	Ac-DEVD-CHO	7.2 \pm 1.8
	Ac-DEVD	7.0 \pm 1.5

The death of F11/APP cell induced by Alz90 antibody was markedly inhibited by 10 μ M Ac-DEVD-CHO (Table 1). From these results, it was verified that Ac-DEVD-CHO inhibited apoptosis of F11/APP cell induced by Alz90 antibody, like in the case with α 1680 antibody. On the other hand, no inhibition effect on the cell death induced by the antibody was observed with Ac-DEVD, which is unmodified with aldehyde at the C terminus and is cell-impermeable (Table 1). These results obtained

shows that the inhibiting effect of DEVD peptide is achieved by the interaction with an intracellular target.

Another experiment was designed to evaluate whether or not other anti-caspase tetrapeptides are also capable of inhibiting the cell death induced by the anti-APP antibody, and if they can do it, to estimate the degrees of inhibition relative to Ac-DEVD-CHO. The following tetrapeptides are known to be specific inhibitors to caspases.

- Ac-YVAD-CHO (Peptide Inc.): inhibitor of the caspase 1 family
- 10 Ac-VEID-CHO (Peptide Inc.): inhibitor of caspase 6
- Z-IETD-CHO (MBL): inhibitor of caspases 6 and 8

As compared with the inhibitors listed above, Ac-DEVD-CHO is capable of inhibiting nearly all types of caspases, and has the highest affinity for the caspase 3 family in particular. The present inventors
 15 treated F11/APP cells with nonspecific IgG, α 1680 antibody (0.5 μ g/ml), or Alz90 antibody (1 μ g/ml) in the presence of each tetrapeptide (10 μ M) in a medium, and stained the cells with trypan blue to assay the cell mortality (Figure 14). All the tetrapeptides had an aldehyde group at their end. The results showed that each peptide inhibited
 20 cell death induced by the anti-APP antibody, and the degree of inhibition was DEVD>YVAD>VEID>IETD in this order (Figure 14).

Among known caspases, no single caspase is known to be inhibited by the tetrapeptides in the same inhibition profile as shown above. These data suggest that at least two types of caspases or an unidentified
 25 caspase should participate in the cell death induced by the antibodies used here. These results are compatible to the finding that the anti-APP antibody triggers apoptosis, which is shown in Example 7. The results also suggest that the blocking property of the tetrapeptides for the death of F11/APP cell induced by α 1680 antibody is the same
 30 as that of the tetrapeptides for the cell death induced by Alz90 antibody. These data are evidence showing that both antibodies induce cell death mediated by the same intracellular machinery triggered by APP as a common target antigen.

35 Example 9. Tissue specificity of cell death induced by APP

The cell-killing effect of the anti-APP antibody was studied

by using other types of cells, in order to clarify the tissue-specificity of cell death induced by the anti-APP antibody. In this experiment with different types of cells, the cells used were selected to express APP₆₉₅ at similar levels to that of F11/APP cell. As can be deduced from the fact that the level of endogenous APP is insufficient to induce cell death in F11 cell, the expression level of APP is one of major intracellular determinants of cell-killing effect of the anti-APP antibody. Thus, the present inventors used Bu695 cell (Y. Hayashi et al. 1992, Biochem. Biophys. Res. Commun., 187: 1249), which is a clone of glioma cell line Bu-17 and stably expresses APP₆₉₅. Immunoblot analysis showed that Bu695 cell expressed APP₆₉₅ at a level comparable to F11/APP cell (Figure 1).

In the same manner as in Example 8, the cells were treated with 1 µg/ml nonspecific IgG or Alz90 antibody in the presence or the absence of 10 µM Ac-DEVD-CHO or Ac-DEVD (without aldehyde modification at the C terminus) for 72 hours. The treated cells were stained with trypan blue to evaluate cell death. The results are shown in Table 2. In this experiment, the treatment with 10 µM Ac-DEVD-CHO or Ac-DEVD alone was conducted as a negative control. The values indicated are mean values \pm SD in at least 5 sets of experiments.

Table 2

Mortality rate of Bu695 cell (%)

25	IgG	5.2 \pm 1.0
	Alz90	5.8 \pm 2.0
30	Alz90+Ac-DEVD-CHO	6.2 \pm 1.6
	Alz90+Ac-DEVD	5.7 \pm 2.3
	Ac-DEVD-CHO	5.6 \pm 1.0
	Ac-DEVD	7.6 \pm 1.5

The results showed that, relative to that by the treatment with nonspecific IgG, the mortality rate of Bu695 cell could not be increased

by the treatment with Alz90 antibody even at a high concentration at which the antibody induces death of F11/APP cell with high efficiency (Table 2).

Further, to evaluate whether or not the treatment with the anti-APP antibody results in DNA fragmentation in Bu695 cell, Bu695 cells were treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ nonspecific IgG or Alz90 antibody for 24 hours. In a positive control, Bu695 cells were UV-irradiated ($320 \mu\text{J/cm}^2 \times 10$ seconds) and were recovered as a sample after 24 hours. Alz90 antibody-treated F11/APP cell was used as a control. The results are shown in Figure 15. In addition, Bu695 cells were treated with nonspecific IgG (1 $\mu\text{g/ml}$), Alz90 antibody (1 $\mu\text{g/ml}$), or purified $\alpha 1680$ antibody (0.5 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours. The samples were stained by TUNEL method. As a control, UV-irradiated ($320 \mu\text{J/cm}^2 \times 10$ seconds) Bu695 cells were stained with TUNEL. These results are shown in Figure 16.

As seen in Figures 15 and 16, DNA ladder observed in UV-irradiated Bu695 cells had band sizes corresponding to those of oligonucleosomes, and TUNEL-positive cells increased markedly, while no DNA ladder was observed in Alz90 antibody-treated Bu695 cells and TUNEL-positive nucleus was hardly found. Similar results were obtained with $\alpha 1680$ antibody, namely the antibody did not induce the death of Bu695 cell (relative to that obtained with nonspecific IgG, the mortality rates of Bu695 cell, the death of which was induced by $\alpha 1680$ antibody in the absence and presence of Ac-DEVD-CHO were $119 \pm 4\%$ and $104 \pm 2\%$, respectively). Substantially, DNA fragmentation was not detectable in $\alpha 1680$ antibody-treated Bu695 cell by TUNEL assay (Figure 16).

These data suggest that Bu695 cell is equipped with the apoptotic machinery including DNase but the anti-APP antibody does not induce the death. Hence, it is considered that the intracellular program of apoptosis triggered by APP can work in cells derived from neuron but not from glia.

Example 10. Induction of death of primary cultured neuronal cells

In order to clarify whether or not the death as observed in F11/APP cell can actually take place in the neurons of brain, an experiment was conducted by using primary cultured cells of mouse cortical neuron.

Primary cultured cells of cortical neuron were prepared according

to a method in a reference (Y. Z. Eksioglu et al., Brain Res., 644, 282, 1994). Prepared neuronal cells were incubated with 2 µg/ml nonspecific IgG or Alz90 antibody for 72 hours. Then, the cells were stained with Hoechst 33258 (final concentration; 5 µM) for 1 minute
 5 (Figure 17). The cells were TUNEL-stained by using a kit (Boehringer Mannheim) according to the attached protocol (Figure 18).

The primary cultured cells of cortical neuron were treated with Alz90 antibody. Then it was revealed that Alz90 antibody induced death of primary cultured neuronal cell with morphological changes of the
 10 nucleus specific to apoptosis. The cell death was not induced by nonspecific IgG used as a control (Figure 17). The enhancement of DNA fragmentation was also recognized in the cell death induced by Alz90 (Figure 17).

The effect of caspase on the cell death was investigated, and
 15 the results showed that the cell death was significantly inhibited by Ac-DEVD-CHO, which is a cell-permeable caspase inhibitor, but not by Ac-DEVD (DEVD-AMC; Peptide Inc., used for *in vitro* caspase substrate assay), which has no aldehyde modification at its C terminus nor cell permeability (Figure 18). These results show that neuronal APP
 20 functions on the apoptosis-inducing pathway.

Because the death is induced by APP in the primary cultured neuronal cell as well as F11/APP cell, the utility of F11/APP cell is certified as a model for neuronal cell death in the living body. Furthermore, the death associated with APP activation can be induced
 25 in cells without foreign APP, suggesting that cell death associated with APP activation can actually take place in the living body.

The present invention has revealed that cell death induced by the anti-APP antibody takes place mediated by an apoptosis-inducing program in neuronal cell. A similar phenomenon has been known for
 30 immune cells. The cell-surface Fas/CD95 induces cell death responding to a specific antibody (S. Nagata, 1997, Cell 88: 355). There are three main features in this system; firstly, the cell death induced by the antibody is classified as apoptosis; secondly, the antibody acts on a cell-surface transmembrane protein; and thirdly, cell death
 35 is induced by the antibody in tissue-specific manner. The inventive antibody/APP system is also equipped with all the three features,

and transmembrane APP can be assumed to play a similar role in neuronal cell to that of the cell-surface Fas/CD95 in immune cell. There are no homologous regions shared by APP₆₉₅ and Fas/CD95 within their cytoplasmic regions. This raises the possibility that the two utilize
 5 distinct intracellular machineries for the start of apoptosis induction pathway. Indeed, it has been reported that the apoptosis associated with the FAD-type mutant of APP is mediated by G_{βγ} of heterotrimeric G protein, but this is not the case for Fas/CD95 (U. Giambarella et al., 1997, EMBO J. 16: 4897). The expression of Fas/CD95
 10 is not detectable in CNS without any disorder or inflammation (T. Matsuyama et al., 1994, Brain Res. 657: 342; T. Matsuyama et al., 1995, Brain Res. Mol. Brain. Res. 34: 166; G.I. Botchkina et al., 1997, Mol. Med. 3: 765). This suggests that transmembrane APP is expected to generally function for cell death in neuronal apoptosis
 15 excluding those associated with disorders and inflammations. Such neuronal apoptosis includes programmed cell death in developing CNS, etc.

Example 11. Construction of inducible expression system for familial
 20 AD-type APP mutant (FAD-APP)

Previously, the present inventors demonstrated by using TUNEL staining that transient expression of three types of V642 mutant of APP₆₉₅ (FAD-APPs), which were found in familial Alzheimer's disease (FAD), in F11 cells caused DNA fragmentation (T. Yamatsuji et al.,
 25 1996, Science 272: 1349-1352). However, the rate of gene introduction was low and the expression was hardly synchronized in such experiments of transient expression by transfection. These problems make it difficult to conduct detailed analyses for cell death, including whether or not the cell death is apoptotic. The previous system is
 30 immature to use for the screening of cell death inhibitors and such.

Then, an attempt was made to construct an inducible FAD-APP expression system where the expression of active APP mutant could be induced by an external stimulus. The expression of FAD-APP (V642I APP) is induced in response to ecdysone in F11 cell line in the
 35 constructed system (F11/EDXR/V642I) (Figure 19). First, a vector (pVgRXR; Ecdysone-inducible Mammalian Expression Kit, Invitrogen)

capable of expressing both ecdysone receptor and RXR was transfected into F11 cell, and the transformed cells were selected by Zeocin to obtain F11 cells (F11/EDXR) expressing ecdysone receptor and RXR. In the next step, a full-length V642I APP cDNA (T. Yamatsuji et al., 5 1996, Science 272: 1349-1352) was inserted into pIND vector (Invitrogen) containing an ecdysone receptor responsive element. The resulting plasmid was introduced into F11/EDXR cells by transfection. The cells were selected by G418. The cells obtained were subjected to limiting dilution and finally F11/EDXR/V642I cell was cloned.

10 The cells were cultured in Ham F-12 medium containing 10% FBS for 24 hours and then incubated in Ham F-12 medium containing 10% FBS and ecdysone (20 μ M; Muristerone). The incubation for 2 to 3 days successfully resulted in the induction of cell death for 80 to 90% of the cells (Figure 20). In a control without ecdysone, cell death 15 was hardly induced. Further, the cell death induced by the addition of ecdysone was inhibited by Ac-DEVD-CHO. Associated with cell death, typical nuclear cleavage, cellular blebbing, and cytoplasmic shrinkage were observed, and the cells were ultimately released from the dish (Figures 21 and 22). Instead of 20 μ M Muristerone, 40 μ M Ponasterone 20 was used as ecdysone, and the result obtained was the same as the former.

As described above, an induction system was constructed for the expression of familial Alzheimer's disease-type mutant APP or active APP mutant. The induction system has made it possible to analyze the 25 function of familial AD-type APP mutant and to screen inhibitors for cell death associated with FAD-APP. Moreover, the above-mentioned data have demonstrated that APP V642I mutant induces apoptosis and APP mutations found in FAD activate the induction function for apoptosis associated with APP.

30

Industrial Applicability

The present invention has revealed that APP agonists are capable of inducing death of neuronal cell with very high efficiency. The inventive cell lines have made it possible to screen agents for inducing 35 cell death associated with APP activation, such as APP ligands. An induction system for the expression of active APP mutant is further

provided. These systems have also made it possible to screen agents for inhibiting cell death associated with APP activation, such as APP antagonists. The agents for inhibiting cell death that are obtained by the screening are expected to be used as agents for treating diseases
5 associated with neuronal cell death, including Alzheimer's disease.

CLAIMS

1. A neuronal cell expressing a foreign APP that induces the death of the cell when activated.

5 2. The neuronal cell of claim 1, wherein the APP is APP₆₉₅.

3. The neuronal cell of claim 1 or 2, wherein the cell is an F11 cell.

4. The neuronal cell of claim 3, wherein the total intracellular expression level of endogenous APP and the foreign APP is about 20
10 times as much as the expression level of endogenous APP alone.

5. A neuronal cell inducibly expressing an active APP mutant that induces the death of the cell.

6. The neuronal cell of claim 5, wherein the cell contains a vector comprising a DNA encoding a nuclear receptor and a vector
15 * comprising a DNA encoding an active APP mutant that is functionally connected downstream of a responsive element for the nuclear receptor and wherein the expression of the active APP mutant can be induced by contact of a ligand with the nuclear receptor.

7. The neuronal cell of claim 6, wherein the nuclear receptor
20 * is an ecdysone receptor and wherein the expression of the active APP mutant is induced by the treatment with ecdysone.

8. The neuronal cell of any one of claims 5 to 7, wherein the cell is an F11 cell.

9. A method for inducing neuronal cell death associated with
25 APP activation, the method comprising contacting a compound inducing APP activation with a neuronal cell expressing an APP that induces the death of the cell when activated.

10. The method of claim 9, wherein the neuronal cell is the neuronal cell of any one of claims 1 to 4.

30 11. The method of claim 9, wherein the neuronal cell is a primary cultured cell derived from a brain cortex neuron.

12. The method of any one of claims 9 to 11, wherein the compound is an antibody that binds to APP.

13. The method of claim 12, wherein the antibody is an antibody
35 that binds to the extracellular region of an APP.

14. A method for inducing neuronal cell death associated with

APP activation, the method comprising contacting a compound inducing the expression of an active APP mutant with the neuronal cell of any one of claims 5 to 8.

15 15. A method for screening a compound inducing neuronal cell death associated with APP activation, the method comprising:

- (a) contacting a test sample with a neuronal cell expressing an APP that induces the death of the cell when activated,
- (b) detecting the death of the neuronal cell, and
- (c) selecting a compound inducing the death of the neuronal cell.

10 16. The method of claim 15, wherein the neuronal cell is the neuronal cell of any one of claims 1 to 4.

17. The method of claim 15, wherein the neuronal cell is a primary cultured cell derived from brain cortex neuron.

15 18. A method for screening a compound inhibiting the induction of neuronal cell death associated with APP activation, the method comprising:

- (a) contacting a compound inducing APP activation and a test sample with a neuronal cell expressing an APP that induces the death of the cell when activated,

20 (b) detecting the death of the neuronal cell, and

- (c) selecting a compound inhibiting the induction of the death of the neuronal cell.

19. The method of claim 18, wherein the neuronal cell is the neuronal cell of any one of claims 1 to 4.

25 20. The method of claim 18, wherein the neuronal cell is a primary cultured cell derived from a brain cortex neuron.

21. The method of any one of claims 18 to 20, wherein the compound inducing APP activation is an antibody that binds to an APP.

22. The method of claim 21, wherein the antibody is an antibody
30 that binds to the extracellular region of an APP.

23. A method for screening a compound inhibiting or enhancing the induction of neuronal cell death associated with APP activation, the method comprising:

- (a) contacting a compound inducing the expression of an active
35 APP mutant and a test sample with the neuronal cell of any one of claims 5 to 8,

- (b) detecting the death of the neuronal cell, and
- (c) selecting a compound inhibiting or enhancing the induction of the death of the neuronal cell.

24. A kit for screening a compound inducing neuronal cell death
5 or a compound inhibiting or enhancing the induction of neuronal cell death, the kit comprising the neuronal cell of any one of claims 1 to 8.

25. An agent for inducing neuronal cell death, the agent
10 comprising as an active ingredient a compound inducing neuronal cell death associated with APP activation.

26. The agent of claim 25, wherein the compound is an APP agonist.

27. The agent of claim 26, wherein the APP agonist is an antibody
that binds to an APP.

28. The agent of claim 27, wherein the antibody is an antibody
15 that binds to the extracellular region of an APP.

29. An inhibitor of neuronal cell death, which comprises as an active ingredient a compound inhibiting the induction of neuronal cell death associated with APP activation.

30. The inhibitor of claim 29, wherein the compound is an APP
20 antagonist.

31. The inhibitor of claim 29 or 30, wherein the inhibitor is an agent for preventing or treating a disease caused by neuronal cell death.

32. The inhibitor of claim 31, wherein the disease is Alzheimer's
25 disease.

ABSTRACT

By preparing neuronal cell stably overexpressing APP and by acting an APP agonist on the neuronal cell, the present inventors developed a system to induce cell death with high efficiency. Preparing a neuronal cell line in which the expression of mutant APP found in familial Alzheimer's disease can be induced by a foreign stimulus, the inventors also succeeded in induction of cell death with high efficiency by inducing the expression of the mutant APP. These systems make it possible to screen agents for controlling cell death in both sporadic and familial Alzheimer's diseases. The agents for inhibiting cell death associated with APP activation that can be obtained by the method of the present invention are useful for the treatment of diseases involved in neuronal cell death including Alzheimer's disease, in which neuronal cell death is necessary to be controlled.